



**Titre:** Silençage du gène ApoB codant pour l'apolipoprotéine B  
**Title:** responsable de l'athérosclérose, in vitro et in vivo, à l'aide des nanoparticules chitosane/siARN-ApoB

**Auteur:** Rabeb Mouna Derbali  
**Author:**

**Date:** 2014

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Derbali, R. M. (2014). Silençage du gène ApoB codant pour l'apolipoprotéine B  
**Citation:** responsable de l'athérosclérose, in vitro et in vivo, à l'aide des nanoparticules chitosane/siARN-ApoB [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/1560/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**  
Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/1560/>  
**PolyPublie URL:**

**Directeurs de recherche:** Abderrazzak Merzouki, & Michael D. Buschmann  
**Advisors:**

**Programme:** Génie biomédical  
**Program:**

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

SILENÇAGE DU GÈNE APOB CODANT POUR L'APOLIPOPROTÉINE B  
RESPONSABLE DE L'ATHÉROSCLÉROSE, IN VITRO ET IN VIVO, À  
L'AIDE DES NANOPARTICULES CHITOSANE/SIARN-APOB

RABEB MOUNA DERBALI

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

SEPTEMBRE 2014

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

SILENÇAGE DU GÈNE APOB CODANT POUR L'APOLIPOPROTÉINE B RESPONSABLE  
DE L'ATHÉROSCLÉROSE, IN VITRO ET IN VIVO, À L'AIDE DES NANOPARTICULES  
CHITOSANE/SIARN-APOB

présenté par : DERBALI Rabeb Mouna

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. LESAGE Frédéric, Ph. D., président

M. MERZOUKI Abderrazzak, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. BUSCHMANN Michael, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. HENRY Olivier, Ph. D., membre

## DÉDICACE

*Je dédie ce mémoire à ma famille avec tous mes sentiments de respect, d'amour et de gratitude.*

## REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements sont pour les membres du jury.

Je remercie très sincèrement mon directeur de recherche Abderrazzak Merzouki qui m'a été d'une aide inestimable durant ma scolarité de maîtrise. Mes remerciements vont également à mon codirecteur Michael D. Buschmann pour tous les conseils.

Je remercie particulièrement Myriam Jean pour son aide, sa très grande disponibilité et sa bienveillance.

Merci aussi à mes collègues et à toute l'équipe du Dr. Buschmann pour leur aide et leur soutien moral, particulièrement Chi-Yuan Chang, Diogo Lopes De Jesus, Daniel Veilleux, Almas Fatima Siddiqui, Laurent Bartolo, Mohamad El Ariss, David Fong, Monica Nelea Iliescu et Julie Tremblay.

Je remercie mes amies que j'ai rencontrées à l'école polytechnique, spécialement Nesrine Riahi, Colleen Mathieu, Kjersti Rise et Ines Hammami pour leur disponibilité et leur encouragement.

Je tiens à remercier ma chère famille, qui m'a toujours fait confiance et qui m'a permis de financer mes études et mon séjour au Québec.

## RÉSUMÉ

L'athérosclérose est une cause sous-jacente des maladies cardiovasculaires. Le nombre de décès causés par ces maladies est estimé à 17,3 millions soit 30% de la mortalité mondiale totale. L'apolipoprotéine B (ApoB) joue un rôle important dans l'initiation de l'athérosclérose. En fait, c'est le précurseur des lipoprotéines à faible densité (LDL) responsables de l'activation de l'athérosclérose quand ils s'infiltrant dans l'espace sous-endothélial et s'oxydent. La réduction de l'ApoB dans le sang diminue le risque de l'athérosclérose. L'utilisation des siARN est prometteuse pour silencer le gène ApoB et pour prévenir la maladie. Toutefois, les siARN sont facilement dégradables dans le sang. Ce qui peut diminuer leur efficacité.

Le chitosane, un polymère cationique naturel et biodégradable, peut servir comme un système de livraison des siARN jusqu'à l'intérieure des cellules cibles. Le chitosane est caractérisé par ses propriétés physicochimiques notamment le DDA, la MM et le ratio N : P. La formulation du chitosane est écrite comme suit : DDA-MM-N : P. Dans notre étude, les formulations utilisées sont 80-10-5, 80-40-5, 92-10-5 et 92-40-5. De plus, nous avons choisi trois siApoB modifiés ou non modifiés chimiquement. Les 12 nanoparticules ont été testées à fin de sélectionner la moins toxique et la plus efficace.

Le diamètre des nanoparticules tel que déterminé par DLS varie entre 71 et 135 nm. Les nanoparticules formées de chitosane et des siApoB qui contiennent le plus de modifications chimiques 2'-O-méthylation et des liaisons phosphotioates sont de plus grandes tailles. L'ESEM montre que les nanoparticules sont sphériques et confirme que les siApoB modifiés forment avec le chitosane des nanoparticules de taille plus grande que les nanoparticules chitosane/siApoB non modifiés. Le potentiel  $\zeta$  des nanoparticules est positif et varie entre +19 et +31 mV. Le test de stabilité démontre que le chitosane peut former des nanoparticules stables à pH 6,5 avec tous les siApoB. Le test de cytotoxicité AlamarBlue<sup>®</sup> montre que les nanoparticules chitosane/siApoB sont moins toxiques que les nanoparticules à base de l'agent commercialisé de transfection DharmaFECT<sup>®</sup> complexé avec les siApoB. La microscopie confocale prouve que les nanoparticules chitosane/siApoB sont capables de franchir la membrane cellulaire et l'endosome pour libérer les siApoB dans le cytoplasme des cellules HepG2. La cytométrie en flux montre que le chitosane 92-40-5 complexé avec les siApoB modifiés et non modifiés transfecte mieux les cellules HepG2 que DharmaFECT<sup>®</sup> complexé avec les mêmes siARN. La qRT-PCR démontre que les nanoparticules 92-40-5/siApoB et 92-10-5/siApoB peuvent induire un silençage de plus

que 60% du gène ApoB *in vitro*. Cette efficacité est comparable à celle du DharmaFECT<sup>®</sup>/siApoB. L'étude *in vitro* a aussi montré que la modification chimique des siARN n'influence pas l'efficacité de transfection, le silençage et la toxicité des nanoparticules chitosane/siApoB.

Nous avons montré dans une autre partie que les nanoparticules chitosane 92-10-5/siApoB1 sont efficaces pour silençer le gène ApoB *in vivo*. Après 3 injections durant 3 jours successifs de nanoparticules chitosane/siApoB avec une dose de 1 mg/kg, le taux d'ARNm ApoB a été réduit, chez les souris C57BL/6 qui ont suivi une diète riche en gras, à un niveau comparable à celui des souris saines. La même étude animale a déjà montré que les souris traitées ont moins d'apolipoprotéine B circulant dans le sang.

En guise de conclusion, les siApoB modifiés forment avec le chitosane des nanoparticules efficaces et peu toxiques. Leur utilisation est avantageuse dû à leur stabilité en milieu physiologique et leurs effets hors cibles faibles. L'utilisation du chitosane comme un système de livraison pour les siARN qui cible l'ARNm ApoB est une approche prometteuse pour traiter l'athérosclérose.

## ABSTRACT

Atherosclerosis is an underlying cause of cardiovascular disease. The number of deaths caused by these diseases is estimated at 17,3 million or 30% of total global mortality. Apolipoprotein B (ApoB) plays an important role in the initiation of atherosclerosis. In fact, it is the precursor of low-density lipoprotein (LDL) responsible for the activation of atherosclerosis when they seep into the subendothelial space and oxidize. ApoB reduction in blood reduces the risk of atherosclerosis. The use of siRNA is promising to silence the ApoB gene and prevent disease. Nevertheless, siRNA are easily degradable in the blood. This may decrease their effectiveness.

Chitosan, a natural and biodegradable cationic polymer, is able to serve as a delivery system of siRNA to the interior of target cells. Chitosan is characterized by its physicochemical properties, including DDA, the MW and N: P ratio. Chitosan's formulations are written as DDA-MW-N: P. In this study, chitosan's formulations used are 80-10-5, 80-40-5, 92-10-5 and 92-40-5. Furthermore, we selected three siApoB either chemically modified or not. Chitosan/siApoB nanoparticles were tested in order to select the least toxic and most effective.

Chitosan/siApoB nanoparticles diameter, as determined by DLS, varies between 71 and 135 nm. Nanoparticles that contain the most chemically modified siApoB are larger. ESEM shows that nanoparticles are spherical and confirms that modified siApoB form nanoparticles with larger size than chitosan/siApoB unmodified nanoparticles. The  $\zeta$  potential of nanoparticles is positive and varies between +19 and +31 mV. Stability test showed that chitosan can form stable nanoparticles at pH 6,5. AlamarBlue<sup>®</sup> cytotoxicity test shows that chitosan/siApoB nanoparticles are less toxic than DharmaFECT<sup>®</sup>/siApoB. Confocal microscopy shows that chitosan/siApoB nanoparticles are able to cross the cell membrane and to release siApoB into the cytoplasm of HepG2 cells. Flow cytometry showed that chitosan 92-40-5 complexed with modified and unmodified siApoB transfected HepG2 cells better than the commercially available transfection agent DharmaFECT<sup>®</sup> with the same siApoB. The qRT-PCR shows that 92-40-5/siApoB and 92-10-5/siApoB can induce more than 60% of ApoB gene silencing *in vitro*. This efficiency is comparable to DharmaFECT<sup>®</sup>/siApoB. *In vitro* study has also shown that chemical modifications of siRNA did not affect the efficiency of transfection, the percentage of silencing and toxicity of chitosan/siApoB nanoparticles.

We have shown that 92-10-5/siApoB1 nanoparticles are effective to silence ApoB gene *in vivo*. Three injections during three successive days at a dose of 1 mg/kg of chitosane 92-10-5/siApoB



unmodified nanoparticles were able to reduce ApoB mRNA level, in C57BL/6 mice following a high-fat diet, to achieve the same level in healthy mice. The same animal study has shown that the treated mice have less apolipoprotein B in the blood.

In conclusion, chemically modified siApoB form effective and non-toxic nanoparticles with chitosan. Their use is advantageous due to their stability under physiological conditions and their low off target effects. The use of chitosan as a delivery system for siRNA targeting ApoB mRNA is a promising approach to treat atherosclerosis.

## TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS .....	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT .....	VII
TABLE DES MATIÈRES .....	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XIV
LISTE DES FIGURES.....	XV
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	XVIII
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1    REVUE DE LITTÉRATURE .....	4
1.1    L'athérosclérose .....	4
1.1.1    Facteurs de risques .....	4
1.1.2    Physiopathogenèse de l'athérosclérose .....	5
1.1.3    Les traitements contre l'athérosclérose .....	11
1.2    L'apolipoprotéine B .....	12
1.2.1    Structure de l'apolipoprotéine B .....	12
1.2.2    L'édition de l'ARNm de l'apolipoprotéine B .....	13
1.2.3    Le rôle de l'apolipoprotéine B et le risque de maladies cardiovasculaires .....	14
1.3    L'ARN interférence.....	15
1.3.1    Mécanismes d'action des miARN.....	15
1.3.2    Mécanismes d'action des siARN .....	15
1.3.3    Conception des siARN .....	16
1.3.4    Les effets non spécifiques .....	17
1.3.5    Modifications chimiques des siARN.....	18

1.4	Systèmes de livraison des siARN.....	21
1.4.1	Systèmes d'origine virale pour la livraison des siARN .....	23
1.4.2	Conjugaison des siARN avec des stéroïdes ou des lipides .....	23
1.4.3	Liposomes et lipoplexes comme systèmes de livraison des siARN.....	23
1.4.4	Systèmes polymériques pour la livraison des siARN .....	24
1.5	Le chitosane.....	25
1.5.1	Production du chitosane .....	25
1.5.2	Propriétés physicochimiques du chitosane.....	26
1.5.3	Formation des nanoparticules chitosane/siARN .....	26
1.5.4	Propriétés des nanoparticules chitosane/siARN.....	26
1.5.5	Modifications chimiques des nanoparticules à base de chitosane contenant les siARN.....	28
1.5.6	Chitosane et siARN modifiés.....	30
1.6	Silencage du gène ApoB <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	30
1.6.1	Silencage du gène ApoB <i>in vitro</i> .....	30
1.6.2	Silencage du gène ApoB <i>in vivo</i> .....	32
1.6.3	Silencage du gène ApoB avec les nanoparticules chitosane 92-10-5/siApoB .....	46
CHAPITRE 2	OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES .....	47
2.1	Objectif général .....	47
2.2	Objectifs spécifiques .....	47
2.3	Les hypothèses scientifiques originales de la contribution à la recherche (HSOC).....	47
CHAPITRE 3	MÉTHODOLOGIE .....	49
3.1	Choix et synthèse des siApoB.....	49
3.2	Préparation du chitosane .....	50
3.3	Formation des nanoparticules chitosane/siARN .....	51

3.4	Caractérisation physicochimique des nanoparticules chitosane/siApoB .....	52
3.4.1	Détermination de la taille, du potentiel $\zeta$ et de l'indice de polydispersité des nanoparticules.....	52
3.4.2	Analyse de la morphologie des nanoparticules chitosane/siApoB par microscopie électronique à balayage environnemental (ESEM) .....	53
3.4.3	Étude de stabilité des nanoparticules chitosane/siApoB en fonction du temps .....	53
3.4.4	Étude de protection des siApoB par le chitosane contre la digestion des ARNase .....	54
3.5	Étude <i>in vitro</i> .....	54
3.5.1	Culture cellulaire .....	54
3.5.2	Séquençage du gène ApoB.....	55
3.5.3	Transfection des cellules HepG2.....	56
3.5.4	Étude de viabilité des cellules par AlamarBlue® .....	57
3.5.5	Étude par cytométrie en flux de l'internalisation des nanoparticules chitosane/siApoB .....	58
3.5.6	Analyse par microscopie confocale.....	58
3.5.7	Extraction de l'ARN à partir des cellules HepG2 .....	59
3.5.8	Vérification de la qualité et de la concentration de l'ARN extrait.....	59
3.5.9	Réaction de transcription inverse (RT-PCR) .....	60
3.6	Étude <i>in vivo</i> .....	60
3.6.1	Séquençage du gène ApoB.....	60
3.6.2	Étude de silençage du gène ApoB <i>in vivo</i> par les nanoparticules 92-10-5 siApoB1.....	61
3.7	La réaction de polymérisation en chaine en temps réel (qPCR) <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	62
3.8	Tests statistiques.....	63
CHAPITRE 4	RÉSULTATS .....	64

4.1	Caractérisation physicochimique des nanoparticules chitosane/siApoB .....	64
4.1.1	Détermination de la taille des nanoparticules chitosane/siApoB .....	64
4.1.2	Détermination du potentiel $\zeta$ des nanoparticules chitosane/siARN .....	68
4.1.3	Les caractéristiques physicochimiques des nanoparticules chitosane/siApoB .....	69
4.1.4	Étude de stabilité des nanoparticules chitosane/siApoB .....	70
4.1.5	Étude de la protection des siARN par le chitosane contre la digestion des ARNase .....	72
4.2	Étude <i>in vitro</i> .....	74
4.2.1	Séquençage partiel du gène ApoB montrant les séquences cibles des siApoB .....	74
4.2.2	Toxicité et viabilité des cellules transfectées par les nanoparticules chitosane/siApoB par le test d'AlamarBlue® .....	80
4.2.3	Étude, par cytométrie en flux, de l'internalisation par les cellules HepG2 des nanoparticules chitosane/siARN spécifiques aux ARNm ApoB .....	82
4.2.4	Étude, par microscopie confocale, de l'internalisation des nanoparticules chitosane/siARN et leur décomplexation au niveau du cytosol .....	85
4.2.5	Étude du silençage du gène ApoB par PCR en temps réel (qPCR) <i>in vitro</i> .....	89
4.3	Étude <i>in vivo</i> .....	92
4.3.1	Séquençage partiel du gène ApoB murin montrant les séquences cibles des siApoB .....	93
4.3.2	Silençage du gène ApoB, <i>in vivo</i> , par les nanoparticules chitosane 92-10- 5/siApoB1 .....	95
CHAPITRE 5 DISCUSSION .....		102
5.1	Caractérisation physicochimique des nanoparticules chitosane/siApoB .....	103
5.2	Silençage spécifique, <i>in vitro</i> , du gène ApoB médié par les nanoparticules chitosane/siApoB en utilisant les cellules hépatiques HepG2 .....	107
5.3	Étude de l'efficacité de silençage du gène ApoB <i>in vivo</i> .....	113

CONCLUSION .....	116
BIBLIOGRAPHIE .....	118

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1: Exemples documentés des études de silençage du gène ApoB <i>in vivo</i> .....	34
Tableau 1.2: Exemples documentés des souris utilisées pour les études de silençage du gène ApoB <i>in vivo</i> ainsi que les avantages et les inconvénients de leurs utilisations .....	41
Tableau 3.1: Les différentes séquences de siApoB utilisées.....	50
Tableau 3.2: Les différentes formulations de chitosane utilisées.....	51
Tableau 3.3 : Les séquences des couples d’amorces utilisés pour l’amplification des parties qui délimitent les siApoB par PCR .....	55
Tableau 3.4 Les séquences des couples d’amorces utilisés pour l’amplification des parties qui délimitent les siApoB par PCR .....	61
Tableau 4.1 : Taille, potentiel $\zeta$ et PDI des nanoparticules chitosane/siApoB .....	69
Tableau 4.2 : Réduction de la protéine ApoB-100 dans le sang (De Jesus, 2011) et du niveau de l’expression du gène ApoB chez les souris traitées par les nanoparticules chitosane 92-10-5/siApoB1 .....	101

## LISTE DES FIGURES

Figure 1-1 : Structure de l'apolipoprotéine B-100 dans les lipoprotéines de faible densité (LDL) (Encyclopaedia Britannica, 2014).....	13
Figure 1-2 : Les modifications chimiques des siARN (Paroo & Corey, 2004) .....	19
Figure 1-3 : Les différents défis que peuvent rencontrer les siARN administrés par voie systémique (Shim & Kwon, 2010).....	22
Figure 2-1: Organisation du projet de recherche.....	48
Figure 4-1 : Taille des nanoparticules chitosane/siApoB mesurée par DLS pour les formulations de chitosane 80-10-5, 80-40-5, 92-10-5 et 92-40-5 complexées avec siApoB1, siApoB2 ou siApoB3 .....	65
Figure 4-2 : Images des nanoparticules chitosane/siApoB obtenues par microscope électronique à balayage environnemental (ESEM).....	66
Figure 4-3 : Indice de polydispersité (PDI) des nanoparticules chitosane/siApoB pour les formulations 80-10-5, 80-40-5, 92-10-5 et 92-40-5 mesuré par diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	67
Figure 4-4 : Potentiel $\zeta$ des nanoparticules chitosane/siApoB .....	68
Figure 4-5: Étude de la stabilité des nanoparticules chitosane/siApoB à pH=6,5 .....	71
Figure 4-6: Étude de protection des siARN contre la digestion, après une incubation de 30 minutes (A), 1 heure (B), 4 heures (C) ou 24 heures (D), des ARNase.....	73
Figure 4-7: Séquences des trois duplex siApoB utilisés dans ce projet (siApoB1, ApoB2 et ApoB3) .....	75
Figure 4-8: Migration des séquences rétrotranscrites à partir de l'ARNm ApoB extrait des cellules HepG2 qui délimitent la cible des siApoB.....	76
Figure 4-9: Séquence nucléotidique de l'ARNm du gène ApoB humain. Référence NCBI de la séquence : NM_000384.2 .....	78
Figure 4-10: La séquence en acides aminés de la protéine ApoB humaine (4563 acides). Référence NCBI de la séquence : NM_000384.2 .....	79



Figure 4-11: La viabilité des cellules HepG2 transfectées par des nanoparticules chitosane/siApoB, des siApoB seuls, du chitosane seul ou par DharmaFECT/siApoB .....	81
Figure 4-12: Pourcentage des cellules transfectées par siApoB 1ou siApoB2 marqués et livrés par le chitosane ou par DharmaFECT® .....	83
Figure 4-13: La fluorescence moyenne parmi la population sélectionnée des cellules transfectées déterminée par cytométrie en flux .....	84
Figure 4-14: Internalisation des nanoparticules chitosane 80-10-5/siGLO par les cellules HepG2 et libération des siARN à l'intérieur des cellules examinées par microscopie confocale .....	86
Figure 4-15: Internalisation des nanoparticules chitosane 92-10-5/siGLO par les cellules HepG2 et libération des siARN à l'intérieur des cellules examinées par microscopie confocale .....	87
Figure 4-16: Internalisation des nanoparticules chitosane 92-10-5/siGLO par les cellules HepG2 et libération des siARN à l'intérieur des cellules examinées par microscopie confocale (Zoom) .....	88
Figure 4-17: Électrophérogramme d'un échantillon d'ARN de haute qualité (RIN=10) extrait à partir des cellules HepG2 transfectées par les nanoparticules chitosane 80-10-5/siApoB2 .....	90
Figure 4-18: Silençage génique de l'ApoB mesuré par qRT-PCR chez les cellules HepG2 traitées avec les siApoB seuls, livrés par le chitosane ou par le DharmaFECT® .....	92
Figure 4-19: Séquence nucléotidique de l'ARNm du gène ApoB murin. Référence NCBI de la séquence : NM_009693.2 .....	94
Figure 4-20: Analyse par Bioanalyzer 2100 de la qualité de l'ARN total extrait à partir des foies des souris représentée sous forme de gel .....	96
Figure 4-21: Électrophérogramme de l'échelle des poids moléculaires (A), d'un échantillon d'ARN de haute qualité extrait à partir du foie de la souris S4-1 (RIN=8,9) (B) et d'un échantillon partiellement dégradé extrait du foie de la souris qui a suivi une diète riche sans recevoir aucun traitement (RIN=2,4) (C) .....	97

Figure 4-22: Silençage du gène ApoB chez les souris traitées par des nanoparticules chitosane 92-10-5/siApoB1 .....	99
Figure 4-23: La carte thermique, selon la méthode de regroupement d'une seule liaison, de l'expression du gène ApoB chez les souris suivant une diète riche en gras traitées par les nanoparticules chitosane/siApoB.....	100

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

La liste des abréviations présente, dans l'ordre alphabétique, les sigles et abréviations utilisés dans ce mémoire ainsi que leur signification.

2'F	2'-fluoro
2'OMe	2'-O-méthyle
6-FAM	6-carboxyfluorescéine ( <i>6-carboxyfluorescein</i> )
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNp	ADN plasmidique
Apo	Apolipoprotéine
ARN	Acide ribonucléique
ARNase	Ribonucléase
ARNi	Interférence par ARN ( <i>RNA interference</i> )
ARNm	ARN messenger
Ct	Cycle seuil ( <i>cycle threshold</i> )
DDA	Degré de désacétylation
DLS	Diffusion dynamique de la lumière ( <i>dynamic light scattering</i> )
dNTP	Désoxyribonucléoside triphosphate
ESEM	Microscopie électronique à balayage environnemental ( <i>environmental scanning electron microscopy</i> )
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
HDL	Lipoprotéine de haute densité ( <i>high density lipoprotein</i> )
LDL	Lipoprotéine de faible densité ( <i>low density lipoprotein</i> )
LDLox	Lipoprotéine de faible densité oxydée ( <i>oxidized low density lipoprotein</i> )
LDLr	Récepteur de lipoprotéines de faible densité ( <i>low density lipoprotein receptor</i> )

miARN	Micro ARN
MM	Masse moléculaire
N : P	Charge chitosane/acides nucléiques (amine : phosphate)
PEG	Polyéthylène glycol
PEI	Polyéthylèneimine
qRT-PCR	Amplification quantitative en chaîne par polymérase en temps réel ( <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> )
RISC	Complexe de silençage induit par l'ARN ( <i>RNA-induced silencing complex</i> )
shARN	Petit ARN épingle à cheveux ( <i>small hairpin RNA</i> )
siApoB	Petit ARN interférent ( <i>small interfering RNA</i> ) ciblant le gène d'apolipoprotéine B
siARN	Petit ARN interférent ( <i>small interfering RNA</i> )
SNALP	Particules lipides/acides nucléiques stables ( <i>stable nucleic acid-lipid particles</i> )
TNF	Facteur de nécrose tumorale ( <i>tumor necrosis factor</i> )
VLDL	Lipoprotéine de très faible densité ( <i>very low density lipoprotein</i> )

## INTRODUCTION

L'athérosclérose est l'origine de plusieurs maladies cardiovasculaires telles que la maladie coronarienne et la maladie cérébro-vasculaire. De plus, elle présente la première cause de morbidité et de mortalité dans les pays développés. Le nombre de décès causés par cette maladie annuellement est égal au nombre de décès causés par tous les types de cancers combinés (Stocker & Keaney, 2004). Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), le nombre de décès par des maladies cardiovasculaires est 17,3 millions de personnes en 2008 (OMS, 2011b). L'OMS estime qu'en 2030 ce nombre atteindrait 23,6 millions (OMS, 2011a, 2011b). Au Canada, les maladies cardiovasculaires causent la mort d'une personne toutes les 7 minutes (Statistics-Canada., 2011). Les services médicaux, les frais d'hospitalisation, la perte de salaire et la baisse de productivité suite aux maladies du cœur et aux accidents vasculaires cérébraux (AVC) coûtent à l'économie canadienne plus de 20,9 milliards de dollars chaque année (Conference-Board-of-Canada., 2010).

Il existe plusieurs facteurs génétiques et comportementaux induisant l'athérosclérose. Plusieurs données présentées ont indiqué l'impact du mode de vie moderne dans le développement de la maladie (Benditt, 1977; Thouin, 2012). Néanmoins, l'athérosclérose est loin d'être une maladie contemporaine. Les premières traces de la maladie ont été observées chez des momies appartenant à la classe influente dans l'Égypte ancienne (Joseph Emmerich, 2000). Bien évidemment, cette classe avait accès à une alimentation trop riche et une sédentarité (Thouin, 2012). La maladie a été aussi observée chez Ötzi, un homme des glaces mort âgé de 45 ans, qui a vécu il y a plus de 5300 ans dans les alpes. Il a été trouvé au début des années 90 embaumé dans la glace (Frostegård, 2013).

Les lipoprotéines de faible densité (LDL) jouent un rôle important dans le développement de l'athérosclérose. Les statines, un inhibiteur de la 3-hydroxy-3-méthyle-coenzyme A réductase, sont les médicaments les plus utilisés pour diminuer le taux de LDL dans le sang et sont prescrits contre l'athérosclérose. Par contre, ils n'arrivent pas à rétablir le niveau de LDL chez un groupe parmi les patients traités (Tadin-Strapps et al., 2011). De plus, le traitement peut causer chez deux tiers des patients malades des événements coronaires indésirables (Watanabe et al., 2009). L'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA : *Food and Drug Administration*) confirme que les statines peuvent avoir d'autres effets néfastes notamment un dommage hépatique, une perte de mémoire, un risque de diabète et une myalgie (FDA, 2014).

Plusieurs autres effets secondaires sont liés à l'utilisation des statines comme la myopathie et l'élévation du taux de la créatine phosphokinase. Ces effets sont accentués lorsque le traitement est combiné avec les fibrates ou l'acide nicotinique qui sont deux agents qui diminuent le taux des lipides dans le sang (Ballantyne et al., 2003; Moosmann & Behl, 2004; Sinzinger, Wolfram, & Peskar, 2002).

Chaque molécule de LDL contient une seule molécule d'apolipoprotéine B (ApoB). D'une part, l'ApoB est indispensable pour l'intégrité structurelle des LDL (Olofsson & Boren, 2005). D'autre part, l'ApoB est reconnue par le récepteur de LDL (LDLr). Elle permet donc l'assemblage et l'entrée des molécules LDL à l'intérieur de l'espace intimal des artères (Olofsson & Boren, 2005; Stocker & Keaney, 2004). La pénétration des LDL dans la paroi artérielle est une étape cruciale dans l'initiation au développement de l'athérosclérose (Stocker & Keaney, 2004). Un traitement qui diminue le taux de l'apolipoprotéine B dans le sang permettrait d'empêcher l'exposition à l'athérosclérose.

Les petits ARN interférents (siARN) sont des petites molécules d'ARN double brin qui ont été utilisées efficacement pour contrôler spécifiquement l'expression des gènes (Rana, 2007). Le silençage du gène ApoB par les siARN permet de réduire le taux de la protéine ApoB dans le sang. Par conséquent, ce silençage empêcherait le développement de l'athérosclérose. L'efficacité des siARN dépend de leur capacité à franchir les différentes barrières pour atteindre le cytoplasme où ils vont dégrader l'ARN messager (ARNm) cible. Pour cette raison, plusieurs types de modifications chimiques des siARN ont été utilisés à fin d'améliorer leur stabilité et réduire les effets non spécifiques (Jackson et al., 2006; Manoharan, 2004). Les siARN sont modifiés chimiquement soit au niveau du squelette, des glucides ou des nucléobases (Paroo & Corey, 2004). Ils peuvent aussi avoir plusieurs types de modifications en même temps. La modification chimique peut changer la conformation des siARN ce qui peut altérer le comportement pharmacocinétique et l'affinité de la liaison avec l'ARN messager cible. De plus, les siARN modifiés peuvent même causer des effets cytotoxiques (Behlke, 2008; Watts, Deleavey, & Damha, 2008).

Plusieurs systèmes ont été utilisés pour livrer les siARN jusqu'aux cellules cibles et faciliter leur accès au cytoplasme. Il existe des systèmes de livraison viraux et des systèmes non viraux. Les systèmes de livraison viraux sont efficaces et capables de silençer le gène cible à long terme. Toutefois, leur utilisation présente un risque lié à leur immunogénicité (Glover, Lipps, & Jans,

2005; Leung & Whittaker, 2005; Shim & Kwon, 2010). Étant donné la charge négative des siARN, des systèmes de livraisons cationiques ont été développés. Ces systèmes non viraux sont constitués de quatre groupes : les systèmes liposomaux, les dendrimères, les peptides pénétrant dans la cellule (*cell-penetrating peptides* : *CPP*) et les polymères. Leur charge positive leur permet de se complexer aux siARN par une force électrostatique et aussi à franchir la barrière de la membrane cellulaire qui est polyanionique (Akhtar & Benter, 2007). De plus, ils ont des formulations flexibles et leur production est moins coûteuse que l'utilisation des systèmes viraux (Niidome & Huang, 2002). Les polymères présentent une faible toxicité comparativement aux systèmes lipidiques (Al-Dosari & Gao, 2009).

Le chitosane est un polymère cationique qui a montré son efficacité pour la livraison des ADN plasmidiques (ADNp) et des siARN *in vitro* et *in vivo*. C'est un polysaccharide produit de la désacétylation partielle de la chitine, la matière la plus abondante sur terre après la cellulose (Buschmann et al., 2013). Le chitosane est une molécule naturelle, biocompatible, mucoadhésive biodégradable et non toxique (Garcia-Fuentes & Alonso, 2012; Kean, Roth, & Thanou, 2005). Il est composé d'unités de glucosamine et de N-acétyl-glucosamine. Il est caractérisé par son degré de désacétylation (DDA), sa masse moléculaire (MM), et le ratio N : P (amine : phosphate) qui représente le ratio chitosane : acide nucléique. Ces propriétés sont ajustables. Ce qui offre une flexibilité au système de livraison.

Dans cette étude, différentes formulations de chitosane ont été complexées avec un des trois siApoB choisis à fin d'étudier l'efficacité et la toxicité des siARN modifiés chimiquement et livrés par le chitosane *in vitro*. Une étude *in vivo* qui a été déjà réalisée dans notre laboratoire a été poursuivie. Cette étude a pour but d'étudier le silençage du gène ApoB chez les souris C57BL/6 à qui une dose de 1 mg/kg de siApoB livrés par le chitosane a été administrée par voie intraveineuse pendant 3 jours consécutifs.

## CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE

### 1.1 L'athérosclérose

Les maladies cardiovasculaires sont la cause principale de décès dans le monde. L'athérosclérose est la cause de la plupart de ces maladies. Les complications de l'athérosclérose telles que la cardiopathie ischémique, l'accident cardiovasculaire cérébrale et la coronaropathie, sont la première cause de mortalité surtout dans les pays à revenu élevé et les pays à revenu intermédiaire (Braunwald, 1997; OMS, 2013).

Le terme athérosclérose est issu des deux mots grecs : athêrê et sclerosis. Athêrê signifie bouillie et qui correspond dans ce contexte au noyau nécrotique et au dépôt de cholestérol dans la paroi artérielle qui aboutissent à la formation des plaques d'athérome. Sclerosis signifie une induration de la plaque (Tegos, Kalodiki, Sabetai, & Nicolaides, 2001).

L'athérosclérose est une réponse inflammatoire chronique aux lésions de la paroi artérielle suite à l'interaction entre les lipoprotéines modifiées, les macrophages, les lymphocytes T et les cellules endothéliales qui constituent l'artère. Les lipoprotéines à faible densité (LDL : *Low Density Lipoproteine*) oxydées par les radicaux libres d'oxygènes sont phagocytées par les macrophages qui deviennent des cellules spumeuses. Les cellules spumeuses migrent dans la paroi de l'artère et forment un centre de la plaque mature appelé aussi centre athéromateux. Les lésions athéroscléreuses formées contiennent aussi de l'ester de cholestérol, des cellules de muscles lisses qui ont migré et proliféré, d'autres types de cellules (telles que les cellules dendritiques, les mastocytes, les lymphocytes B) et un tissu de connexion composé de collagène, d'élastine et des glycosaminoglycanes (Glass & Witztum, 2001; Tegos et al., 2001). La rupture de la plaque d'athérome formée et fragilisée par l'apoptose cellulaire peut aboutir à des complications telles que l'accident cardiovasculaire après le contact des molécules thrombotiques avec le sang (Van Belle, Bauters, & Chru, 2006).

#### 1.1.1 Facteurs de risques

Avant 1950, il était difficile de déterminer les facteurs de risques de l'athérosclérose puisqu'ils sont étudiés après le développement de la maladie. Par exemple, le taux de cholestérol chez les patients athérosclérotiques ainsi que la tension artérielle sont généralement élevés, mais il était difficile de confirmer qu'il s'agit bien de causes et non pas de conséquences de la maladie. Une étude très connue intitulée « The Framingham Heart Study » menée par l'institut national du



cœur qui avait pour but l'identification des facteurs de risques communs de l'athérosclérose a alors commencé en 1949 dans la ville de Framingham. Durant cette étude, les chercheurs ont examiné une cohorte de plus de 5000 volontaires de 30 à 59 ans en bonne santé. Un sur 20 des individus recrutés a développé la maladie après 4 ans (Dawber, Moore, & Mann, 1957; FHS, 2012). Le nombre de patients malades qui ont moins de 60 ans et qui sont de sexe masculin est deux fois plus élevé que le nombre de patients de sexe féminin pour le même âge. Donc le sexe est un facteur de risque pour le développement de l'athérosclérose. Cela peut être dû aux hormones féminines qui ont un rôle protecteur contre l'athérosclérose. Surtout qu'après la ménopause, l'incidence des patients athérosclérotiques mâles et femelles devient presque égale (Tegos et al., 2001). De la même façon, l'hypercholestérolémie, l'hypertension, l'âge, l'obésité ainsi que l'histoire de la famille ont été identifiés comme des facteurs de l'athérosclérose. Le suivi des patients pendant quelques années a confirmé que le tabac est dans la liste des facteurs de risques. Divers facteurs peuvent prédisposer à l'athérosclérose comme le taux élevé de LDL, la diète riche en gras, le diabète, la sédentarité, le facteur Von Willebrand, le facteur VII, l'augmentation du nombre des plaquettes et de l'agrégabilité plaquettaire, l'homocystinurie, le taux élevé du facteur de fibrinogène homéostatique et le syndrome Hutchinson-Gilford (progéria). La consommation excessive d'alcool est aussi un facteur de risque pour le développement de l'athérosclérose alors que la consommation modérée semble avoir un rôle protecteur (Glass & Witztum, 2001; Tegos et al., 2001). Il existe des facteurs qui n'ont pas un rôle direct dans le développement de la maladie, mais plutôt dans sa complication. Notamment, la prise de pilules contraceptives qui favorise la thrombose (Engel, Engel, & Lichtlen, 1983; Vandenbroucke et al., 1994). En outre, l'effet de l'association de plusieurs facteurs de risques de l'athérosclérose est souvent synergique (Rich-Edwards, Manson, Hennekens, & Buring, 1995; Wilson, P. W. F., 1997).

### **1.1.2 Physiopathogenèse de l'athérosclérose**

L'athérosclérose est en même temps un déséquilibre lipidique et une réponse inflammatoire qui implique le système immunitaire inné et acquis. C'est une maladie qui touche les vaisseaux sanguins. La paroi d'une artère est constituée de 3 couches :

- L'intima (la couche interne qui est en contact direct avec le sang)
- La média (la couche intermédiaire)
- L'adventice (la couche externe)

L'athérosclérose affecte initialement l'intima puis la média au niveau de la bifurcation de l'artère majeure (Tegos et al., 2001).

Plusieurs étapes sont nécessaires pour la formation de la plaque athérosclérotique :

#### **1.1.2.1 L'activation de l'endothélium artériel par les LDL oxydés**

La formation de la plaque athérosclérotique débute par l'activation inflammatoire des cellules endothéliales. Cette activation favorise le recrutement des monocytes et des lymphocytes en induisant l'expression d'intégrines et de protéines d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1) à la surface de l'endothélium. De plus, elle augmente la perméabilité aux lipoprotéines athérogènes et l'activité de la NADH/NADPH oxydase endothéliale qui induit un stress oxydant en produisant l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ). Les cellules endothéliales peuvent être activées suite à l'infiltration des LDL retenus dans l'espace sous-endothéliale ou par des facteurs hémodynamiques (l'hypertension), chimiques (le taux élevé de cholestérol), immunologiques (complexes immuns), par des agents infectieux ou par le facteur de nécrose tumorale (TNF) (Duriez, 2004; Tedgui & Mallat, 2001; Tegos et al., 2001). Les zones où il y a les forces de cisaillement les plus faibles et les flux turbulents les plus importants comme les zones de bifurcations et de courbures artérielles sont le site privilégié de cette activation (Ait-Oufella, Tedgui, & Mallat, 2008). La pénétration passive des LDL est due à leurs taux élevés dans le sang. Les LDL sont oxydés (LDLox) par les radicaux libres d'oxygène circulant dans le sang ou par des agents oxydants comme l'oxyde nitrique (produit par les cellules endothéliales et les macrophages), la myéloperoxydase (MPO), l'oxyde nitrique synthase (NOS) ou le 15-lipoxygénase (15-LO) (Glass & Witztum, 2001). Les récepteurs des LDL (LDLr) découverts par Brown et Goldstein sont présents sur les cellules hépatiques et reconnaissent la région carboxy-terminale de l'apolipoprotéine B-100 présent dans le LDL (**Figure 1-1**) (Benn, 2009; Brown & Goldstein, 1983; Scheen, AJ, 1996; Vaubourdolle, 2007). La modification du LDL peut être soit une modification minimale (mmLDL) soit une oxydation intense (LDLox). Dans le cas d'une modification minimale, l'apolipoprotéine B-100 n'est pas modifiée et les LDLr reconnaissent toujours le LDL. Dans le cas du LDLox, la structure antigénique du LDL serait modifiée. Il peut y avoir une fragmentation de l'apolipoprotéine B et l'apparition de néo-épitopes. Par conséquent, le LDL ne sera plus reconnu par ses récepteurs. Le LDLox et le mmLDL ont des propriétés pro-inflammatoires et pro-athérogéniques (Glass & Witztum, 2001; Nalbone, Peiretti, Canault, & Alessi, 2006; Stocker & Keaney, 2004). Les LDLr permettent l'épuration des LDL oxydés circulant dans le plasma. Cependant, il existe une autre

voie d'épuration des LDL modifiés: ce sont les récepteurs éboueurs (*scavenger receptor*). Ces molécules sont exprimées par les cellules présentatrices d'antigène (CPA). Elles ont été mises en évidence chez les patients qui ont une hypercholestérolémie familiale homozygote. Chez ces derniers, les récepteurs LDLr sont totalement absents. C'est plutôt les récepteurs éboueurs des cellules spumeuses (des monocytes ou des cellules musculaires lisses) qui sont responsables de l'épuration des LDL (Ait-Oufella et al., 2008; Brown, Basu, Falck, Ho, & Goldstein, 1980; Goldstein & Brown, 1977).

### **1.1.2.2 Recrutement des monocytes et leur transformation en macrophages puis en cellules spumeuses**

Une fois les cellules endothéliales activées, elles expriment des protéines qui permettent le recrutement et l'adhérence des leucocytes. Trois grandes familles de molécules d'adhérence cellulaire (CAM) peuvent être distinguées:

**Les sélectines :** La P-sélectine est la plus grosse des sélectines exprimées par les cellules endothéliales. Elle se trouve, à l'état normal, dans le corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales. Elle se lie à son ligand, exprimé par les leucocytes, le PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) de façon instable et réversible. La E-sélectine permet l'entrée des monocytes dans l'espace sous endothéliale (Glass & Witztum, 2001).

**La superfamille des immunoglobulines :** Il existe plusieurs immunoglobulines qui jouent un rôle primordiale dans le développement des plaques d'athérosclérose telles que le CD-54 ou l'ICAM (*intercellular cell adhesion molecule-1*) qui est le ligand principal des  $\alpha$ Lb2 et  $\alpha$ Mb2 (des intégrines leucocytaires) et qui est exprimé sur les leucocytes et sur les cellules endothéliales, le CD-106 ou VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) qui adhère les lymphocytes et les monocytes par la fixation à ses ligands VLA-4 (*very late antigen-1 or 4b1*) et  $\alpha$ 4b7 et qui est exprimé par les cellules endothéliales après leur activation. Les immunoglobulines CD-31 ou PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule*) sont exprimées au niveau des jonctions cellulaires des cellules endothéliales de façon abondante et aussi par de nombreuses autres cellules (Hansson, 2001; Potteaux, Tedgui, & Mallat, 2006).

**Les chimiokines :** Ils sont des acteurs essentiels de la réponse immunitaire suite au dysfonctionnement des cellules endothéliales sous l'effet de LDLox, du lipopolysaccharide (LPS), des cisaillements endothéliaux et surtout sous l'effet des

cytokines inflammatoires telles que TNF $\alpha$ , l'IL-1 ou l'IFN $\gamma$ . Les chimiokines ont pour rôle d'attirer les monocytes et les lymphocytes vers les sites d'inflammation en se liant aux récepteurs exprimés à leur surface. Le MCP-1 (*monocyte chemokine protein*) est une chimokine produite par les cellules endothéliales et les cellules musculaires. Elle stimule la migration des cellules et diminue, comme le RANTES (*regulated in activation, normal T-cell expressed and secreted*), la vitesse de roulement des monocytes et des lymphocytes sur l'endothélium. Le GRO- $\alpha$  joue un rôle spécifique dans la fixation des cellules du système immunitaire à l'endothélium. La fraktaline adhère les leucocytes et augmente l'avidité pour les récepteurs des intégrines leucocytaires en changeant la conformation de ces derniers (Potteaux et al., 2006).

Les LDL infiltrés dans l'espace sous-endothélial qui sont oxydées (LDLox) peuvent causer directement le recrutement des leucocytes ainsi que la production de molécules pro-inflammatoires permettant le roulement puis l'arrêt des monocytes et des lymphocytes. Les monocytes qui ont pénétré dans l'endothélium se différencient sous l'action des M-CSF en macrophages. Ces derniers phagocytent les LDLox à l'aide des récepteurs éboueurs (SR-AI, SR-AII, CD-36...) et deviennent des cellules spumeuses (Ait-Oufella et al., 2008; Duriez, 2004; Potteaux et al., 2006; Tegos et al., 2001). Les cellules spumeuses peuvent se surcharger par une grande quantité de différentes formes de LDL puisque le contenu intracellulaire ne joue pas un rôle d'inhibiteur de captation (De Winther, Kanters, Kraal, & Hofker, 2005). Les deux types de macrophages: les macrophages inflammatoires et les cellules spumeuses sont présents dans le site d'inflammation. Les stries lipidiques qui apparaissent sont caractéristiques des lésions de type I et II de l'athérosclérose. Ils se produisent chez les individus jeunes âgés de 0 à 10 ans (Joseph Emmerich, 2000). Ce stade est asymptomatique et réversible (Hansson & Libby, 2006).

### **1.1.2.3 Formation de la plaque mature**

Les cellules spumeuses s'internalisent dans la paroi artérielle induisant une réponse inflammatoire chronique. Les cellules musculaires lisses migrent du média vers l'intima où elles prolifèrent en présence de plusieurs facteurs de croissance tels que le PDGF (*platelet derived growth factor*) sécrété par les plaquettes et les cellules endothéliales. Les cellules spumeuses, les cellules musculaires lisses et le lipide extracellulaire vont former un cœur lipidique. La chape fibreuse contient une matrice de collagène, d'élastine et de protéoglycane. D'autres types de cellules telles que les cellules dendritiques, les mastocytes, les lymphocytes B et les lymphocytes

NK (*natural killer*) sont aussi présents dans le centre des plaques matures appelé aussi le centre athéromateux. Les macrophages inflammatoires et les lymphocytes T sont présents d'une façon abondante sur l'interface qui sépare le cœur lipidique et la chape fibreuse. Les macrophages expriment des molécules de CMH (*MHC : Major Histocompatibility Complex*) de classe II et présentent ainsi l'antigène aux cellules T (Hansson & Libby, 2006; Tegos et al., 2001). Chez l'Homme, les cellules endothéliales peuvent aussi présenter l'antigène aux cellules T puisqu'ils expriment les CMH I et II ainsi que des molécules costimulatrices (LFA-3(CD-58), CD-40, ICOS-L, 41BB-L...) qui agissent au niveau de la réactivation des cellules mémoires (Birgit Fogal & Pober, 2012). Néanmoins, il existe d'autres molécules co-stimulatrices présentes sur les CPA professionnels comme B7-1 (CD-80) et B7-2 (CD-86) qui ne sont pas exprimées par les cellules endothéliales.

#### **1.1.2.4 Évolution de la plaque**

L'amplification de la réponse inflammatoire aide à l'évolution de la plaque d'athérome (Broisat, Riou, Fagret, & Ghezzi, 2005). Les principaux acteurs de cette étape sont les lymphocytes T. En effet, ils assurent trois fonctions principales : une fonction auxiliaire (Th), une fonction suppressive (Treg) et une fonction cytotoxique (Tc). Les lymphocytes Th exprimant à leur surface la glycoprotéine CD-4<sup>+</sup> qui jouent un rôle proathérogène important. Ils présentent 10 à 20% des cellules immunitaires dans la plaque athéromateuse (Ait-Oufella et al., 2008). Il existe deux types de lymphocytes T auxiliaires : Th1 et Th2 qui se distinguent par les différentes cytokines qu'ils secrètent. La plupart des cellules Th activées par le LDLox sont de type Th1 (Hansson & Libby, 2006). Les cellules Th1 produisent plusieurs cytokines inflammatoires telles que les interférons gamma (IFN $\gamma$ ) et les TNF (*Tumour-Necrosis Factor*). L'IFN $\gamma$  a un rôle pathogène dans le développement de l'athérosclérose. L'inactivation des récepteurs de l'IFN $\gamma$  réduit de 60% les lésions athéroscléreuses (Gupta et al., 1997). L'IFN $\gamma$  active les cellules endothéliales et stimule l'expression de la molécule VCAM-1. L'IFN $\gamma$  stimule aussi l'expression des cytokines inflammatoires exprimées par les macrophages et augmente l'expression de CMH de classe II par les macrophages et par les cellules musculaires lisses. Par conséquent, l'IFN $\gamma$  aide à activer les macrophages ainsi que leur accumulation dans les sites de lésions et à mieux présenter l'antigène aux lymphocytes T. Il a alors un effet proathérogène (Ait-Oufella, Tedgui, & Mallat, 2006; Glass & Witztum, 2001; Gupta et al., 1997). D'autre part, l'IFN $\gamma$  a un rôle anti-athérogène: Il inhibe la prolifération des cellules musculaires ainsi que la production du collagène

et peut ainsi déstabiliser la plaque. De plus, il diminue l'expression des récepteurs éboueurs exprimés par les macrophages (Gupta et al., 1997). Le TNF est une cytokine pro-inflammatoire qui active la voie NF- $\kappa$ B. Les cellules endothéliales, sous l'effet du TNF, produisent des ROS (*Reactive oxygen species*) et des enzymes protéolytiques. Cette cytokine peut aussi supprimer des lipoprotéines lipases. Par conséquent, des lipoprotéines riches en triglycérides s'accumulent dans le sang. La différenciation des cellules T en phénotype Th1 est due à leur interaction avec les cellules dendritiques exprimant le CD-40 qui est une molécule co-stimulatrice. Les cellules Th1 expriment le ligand de CD-40 (CD-40L ou CD-154) et d'autres cytokines qui ont un rôle pro-athérogène telles que l'IL-18 et l'IL-12 (Hansson & Libby, 2006). La différenciation des cellules T en cellules Th2 est guidée par l'IL6, l'IL4 qui diminuent la production d'IFN $\gamma$  (Birgit Fogal & Pober, 2012). Dans des modèles animaux athérosclérotiques, il a été démontré que les Th2 diminuent la taille des lésions en activant les lymphocytes B pour produire des anticorps de type IgG1 anti-LDLox. Th2 semble alors avoir un effet anti-athérogène. En effet, les souris C57BL/6 ont une réponse immunitaire de type Th1 et les souris BALB/c ont une réponse de type Th2. Les C57BL/6 ont développé des lésions après un régime riche en gras alors que les BALB/c résistent à la maladie malgré le régime riche en gras (Huber, Sakkinen, David, Newell, & Tracy, 2001) (**Tableau 1.2**). STAT6 (*signal transducer and activator of transcription 6*) est un facteur essentiel pour la différenciation des cellules Th2. La délétion du gène qui code pour ce facteur inhibe la réponse Th2 et développe la réponse Th1. Chez les souris BALB/c, cette délétion a permis d'inhiber la résistance des souris pour l'athérosclérose (Huber et al., 2001). Cependant, d'autres études épidémiologiques chez l'Homme montrent que les patients asthmatiques ont un risque accru de développer des plaques d'athérosclérose puisqu'ils ont un profil inflammatoire de type Th2 (Ait-Oufella et al., 2008). L'hypothèse que l'athérosclérose est favorisée par les Th1 et que les Th2 ont un effet opposé protecteur est rejetée.

#### **1.1.2.5 La déstabilisation de la plaque**

La stabilité de la plaque d'athérome dépend de la qualité de la chape fibreuse. La chape fibreuse mince et pauvre en collagène est sujette à la rupture. L'apoptose des cellules présentes favorise la fragilisation de la plaque. L'apoptose des cellules spumeuses est fréquente due à la toxicité des LDLox. Les radicaux libres d'oxygène peuvent également induire l'apoptose des cellules. Les radicaux libres d'oxygène sont formés suite à la production excessive du monoxyde d'azote sous l'effet des cytokines pro-inflammatoires. L'apoptose des macrophages se passe surtout à la base

des plaques. Ce phénomène et la clairance phagocytaire des cellules apoptotiques mènent à la formation d'un corps nécrotique qui déstabilise la plaque. La présence excessive de cytokines et des protéases inflammatoires dans le site de la plaque intervient dans la digestion de la matrice. Les macrophages apoptotiques sécrètent une quantité importante de cytokines inflammatoires et de protéases telles que les métalloprotéinases (MMP). Les MMP sont sécrétées aussi par les cellules musculaires lisses. Les collagénases, les élastases et les stromélines font partie des MMP. Ils jouent un rôle important dans la déstabilisation de la plaque en dégradant ses protéines et la capsule fibreuse qui la stabilise (Broisat et al., 2005; Simionescu & Sima, 2012). D'autres types de cellules participent dans la fragilisation de la plaque : les cellules musculaires lisses diminuent la production du collagène. Les mastocytes produisent des protéases (tryptase et chymase). Les cellules endothéliales deviennent très minces et recouvertes de lipides ce qui facilite l'érosion de la chape fibreuse qu'ils couvrent (Galkina & Ley, 2009; Simionescu & Sima, 2012). De plus, la néoangiogenèse (la formation de nouveaux vaisseaux à partir des vasa-vasorum qui sont les petits vaisseaux de l'adventice) de la plaque est une autre cause de fragilisation et de déstabilisation de la plaque en favorisant son érosion (Broisat et al., 2005; Glass & Witztum, 2001).

#### **1.1.2.6 La rupture de la plaque et la formation du thrombus**

Les plaques d'athérome fragiles appelées aussi plaques vulnérables sont menacées de rupture. La rupture mène à un contact entre les molécules thrombotiques et le sang. Le facteur tissulaire (TF) est une glycoprotéine qui fait partie des molécules thrombotiques. Il est sécrété par les macrophages, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales. Les plaquettes et les leucocytes sont activés par les TF. La formation du thrombus peut induire une ischémie myocardique. La rupture de la plaque est la cause de 55- 60% des morts soudaines. La plaque vulnérable, dans d'autres cas rares, peut devenir stable, fibreuse et calcifiée sans se rompre (Broisat et al., 2005; Burnier, Fontana, Angelillo-Scherrer, & Kwak, 2009).

#### **1.1.3 Les traitements contre l'athérosclérose**

Il existe plusieurs types de traitements contre l'athérosclérose qui dépendent de l'avancement de la maladie. Le traitement chirurgical est utilisé dans les stades avancés. Il existe plusieurs types de médicaments qui sont utilisés avant ce stade : les statines, les fibrates, les résines la niacine, le probucol, et l'ézétimibe. Les plus connus sont les statines qui ont un effet principal

hypocholestérolémiant suite à la diminution de la biosynthèse du cholestérol par inhibition de l'enzyme 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) réductase ainsi qu'un effet anti-inflammatoire. Malgré leurs pléiotropie, ces molécules semblent être insatisfaisantes. Les statines ne réussissent à réduire efficacement le taux de cholestérol-LDL qu'à forte dose toxique (Morozova, Suc-Royer, & Auwerx, 2004; Scheen, A., Radermecker, De Flines, & Ducobu, 2007). Par conséquent, des nouvelles substances prometteuses sont en développement. Notamment, ISIS 301012 (ISIS Pharmaceuticals, Carlsbad, Calif) appelé aussi Mipomersen<sup>®</sup> qui est en phase clinique III. ISIS 301012 est un oligonucléotide antisens (ASO) ayant pour rôle de réduire l'ARNm ApoB et par conséquent diminuer le taux de LDL dans le sang pour traiter l'hypercholestérolémie familiale homozygote (Ito, 2007; Kastelein et al., 2006). Le développement des siARN qui silence l'ARNm d'ApoB fourni une approche innovante.

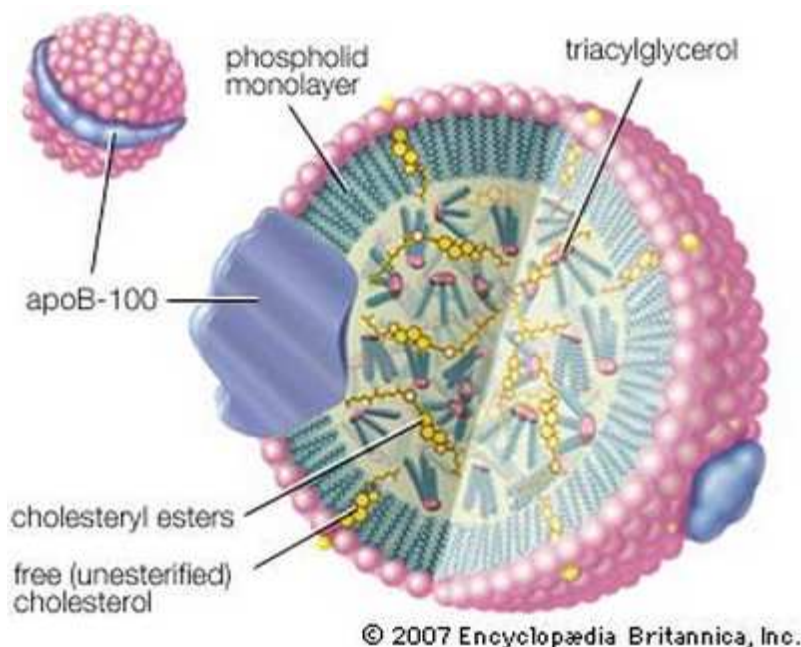
## **1.2 L'apolipoprotéine B**

### **1.2.1 Structure de l'apolipoprotéine B**

Les apolipoprotéines sont amphipatiques. Ils possèdent donc à la fois des régions hydrophiles et des régions hydrophobes. Il existe deux formes d'ApoB chez l'Homme et chez les rongeurs: l'ApoB-100 et l'ApoB-48 qui sont codées par le même gène ApoB. L'ApoB-100 est l'une des plus grandes protéines monomériques (Segrest, Jones, De Loof, & Dashti, 2001). Chez l'Homme, l'ApoB-100 a une masse moléculaire de 540 kDa et possède 4536 acides aminés. La masse moléculaire de l'ApoB-48 est de 48% de la masse moléculaire de l'ApoB-100 (Durrington, 2002). L'apolipoprotéine B est très insoluble dans les solutions aqueuses. L'insolubilité et la grande taille de l'ApoB empêchent l'analyse de sa structure. Segrest et al. a développé un programme bio-informatique appelé LOCATE pour déterminer la structure d'ApoB. L'ApoB-100 est pentapartite : Elle possède deux régions de brins  $\beta$  alternantes avec deux régions d'hélices  $\alpha$  et un domaine d'hélice  $\alpha$  avec une extrémité N-terminal. La structure d'ApoB-100 est alors sous la forme :  $\text{NH}_3\text{-}\alpha_1\text{-}\beta_1\text{-}\alpha_2\text{-}\beta_2\text{-}\alpha_3\text{-COOH}$  (Segrest, Jones, Mishra, Anantharamaiah, & Garber, 1994). La structure tridimensionnelle de l'ApoB-100 n'est pas encore déterminée. Il existe par contre une étude de la structure de l'association de l'ApoB-100 avec la LDL. Chaque molécule de LDL possède une molécule d'ApoB-100 qui l'englobe à sa surface (Segrest et al., 2001) (**Figure 1-1**). Il existe plusieurs mutations connues qui peuvent changer des acides aminés de l'ApoB-100 qui sont responsables de la liaison de la particule LDL avec son récepteur LDLr. La



plus connue est la mutation Arg 3500. L'acide aminé glutamine (CGG) est substitué en arginine (CAG). Cette mutation altère la liaison de l'ApoB avec le récepteur des LDL (Benn, 2009; Borén et al., 1998; Innerarity et al., 1990; Soria et al., 1989). La séquence ApoB-100 humaine a été comparée avec des séquences partielles de 8 autres espèces de vertébrés. D'après cette étude, l'alternance de la partie  $-\beta_1-\alpha_2-\beta_2-\alpha_3-\text{COOH}$  est commune chez les 9 espèces (Segrest et al., 1998).



**Figure 1-1 : Structure de l'apolipoprotéine B-100 dans les lipoprotéines de faible densité (LDL) (Encyclopaedia Britannica, 2014)**

### 1.2.2 L'édition de l'ARNm de l'apolipoprotéine B

L'édition de l'ARN (*RNA editing*) est le phénomène de production d'une séquence d'ARNm différente de la séquence d'ADN transcrite soit par l'ajout, la délétion ou le remplacement de nucléotides (Simpson & Shaw, 1989; Wedekind, Dance, Sowden, & Smith, 2003). L'édition de l'ARNm d'ApoB est la première édition découverte chez les vertébrés (Chen et al., 1987; Powell et al., 1987). Le gène ApoB est localisé dans le brin court du chromosome numéro 2 et comprend 26 exons (Bangert, 2008; Vaubourdolle, 2007). Deux formes naturelles peuvent être produites à partir du gène ApoB : l'ApoB-100 et l'ApoB-48. L'édition post-transcriptionnelle de l'ApoB est

catalysée par APOBEC1 (*ApoB editing catalytic subunit 1*). Au niveau du nucléotide 6666, la cytidine (C) est désaminasée par l'APOBEC1. Ce phénomène la transforme en uridine (U). Cette modification change le codon glutamine (CAA) dans cette position en codon-stop (UAA). L'ApoB-48 est synthétisée suite au phénomène d'édition. Elle est alors identique à 48% de l'ApoB-100 (région N-terminal) (Chan, Chang, Liao, Oka, & Lau, 2000; Lau, Xiong, Zhu, Chen, & Chan, 1991). Chez la plupart des espèces, l'édition de l'ApoB se déroule dans l'intestin, mais chez les souris et les rats elle peut être aussi au niveau du foie (Davidson & Shelness, 2000).

### **1.2.3 Le rôle de l'apolipoprotéine B et le risque de maladies cardiovasculaires**

L'ApoB-100 est synthétisée au niveau du foie et de l'intestin chez les rongeurs et au niveau du foie chez l'Homme. Elle est présente dans les VLDL, les LDL et les IDL (**Figure 1-1**). Elle contient un domaine qui peut être reconnu par le récepteur LDLr (3359-3369). L'ApoB-48 est synthétisée au niveau du foie et de l'intestin chez les rongeurs et au niveau de l'entérocyte chez l'Homme. Elle joue un rôle essentiel dans l'assemblage des chylomicrons ainsi que leur sécrétion dans le sang. L'ApoB-48 ne se lie pas au LDLr. La concentration de l'ApoB-100 dans le sang est d'environ 0,7 à 1 g/L. Un risque élevé d'athérosclérose est associé à l'augmentation de cette concentration. En effet, l'ApoB-100 joue un rôle important dans l'initiation de l'athérosclérose en étant essentielle pour l'assemblage des VLDL (précurseurs de l'IDL et du LDL) et en participant dans l'élimination du LDL du sang en se liant aux LDLr. Le taux élevé de la molécule athérogénique LDL et de l'ApoB dans le sang est un risque de maladie cardiovasculaire. L'ApoB-100 se trouve dans chaque molécule de LDL alors qu'elle est absente dans la molécule antiathérogénique HDL (Benn, 2009; Mullick et al., 2011; Olofsson & Boren, 2005; Vaubourdolle, 2007). Plusieurs études démontrent que l'ApoB est le meilleur prédicteur des maladies cardiovasculaires (Ingelsson et al., 2007; Jiang et al., 2004; McQueen et al., 2008; St-Pierre, Cantin, Dagenais, Després, & Lamarche, 2006; Talmud, Hawe, Miller, & Humphries, 2002). Le développement de l'athérosclérose dépend du ratio ApoB/ApoA qui représente le ratio LDL/HDL (Ridker, Rifai, Cook, Bradwin, & Buring, 2005; Walldius & Jungner, 2006). Des études ont montré que la diminution de l'ApoB dans le sang diminue le taux de LDL et par suite le risque de maladie (Benn, 2009).

### 1.3 L'ARN interférence

Le phénomène d'ARN interférence a été découvert chez les nématodes *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998). Il est devenu, par la suite, un choix de thérapie contre les maladies associées aux gènes. Il a été utilisé pour la première fois dans une étude clinique contre la dégénérescence musculaire liée au vieillissement (*AMD : age-related macular degeneration*) (Fattal & Bochot, 2006). Ce mécanisme régulateur post-transcriptionnel de la plupart des cellules eucaryotes permet le contrôle de l'activité des gènes par la dégradation des ARNm du gène ciblé (*small interfering RNAs*) (Kim, D. H. & Rossi, 2008; Nguyen, Menocal, Harborth, & Fruehauf, 2008). Plusieurs types d'ARN double brin peuvent induire l'ARNi notamment l'ARN viral, les siARN endogènes, les siARN exogènes et les miARN (Rana, 2007).

#### 1.3.1 Mécanismes d'action des miARN

Les miARN sont des petits ARN endogènes non codants qui ont une structure en épingle à cheveux. Ils sont transcrits par l'ARN polymérase II en primiARN (*primary miRNA*) (Rana, 2007). Les primiARN sont clivés par Drosha, une ARNase III, en présence de son cofacteur DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene-8*) (Han et al., 2004). Des pré-miARN de 70 nucléotides qui ont un débordement de deux nucléotides de chaque côté 3' sont alors formés (Kim, V. N., 2005). Les pré-miARN sont exportés vers le cytoplasme de la cellule à l'aide du complexe de l'exportine 5–RanGTP (Lund, Güttinger, Calado, Dahlberg, & Kutay, 2004). Ils sont exportés de ce complexe lorsque la GTP s'hydrolyse en GDP. L'ARNase III endonucléase Dicer clive les pré-miARN en petites séquences de 22 nucléotides: les miARN. Le miRISC (*RNA-induced silencing complex*) guide les miARN jusqu'à la région 3' non transcrite (3'UTR) de la séquence de l'ARN cible. Le miARN reconnaît imparfaitement une courte séquence homologue au sein de cette région de l'ARN appelée région d'initiation (*seed region*). Par conséquent, l'ARN est clivé par le complexe et la traduction est réprimée (Kim, D. H. & Rossi, 2008; Rana, 2007).

#### 1.3.2 Mécanismes d'action des siARN

Chez les cellules mammifères, Dicer clive l'ARN double brin (dsARN) en siARN (Zhang, Kolb, Jaskiewicz, Westhof, & Filipowicz, 2004). Les siARN sont des séquences de 21 à 23 nucléotides avec un débordement de 2 nucléotides de chaque côté 3'. Dans d'autres cas, les siARN sont directement livrés jusqu'au cytoplasme de la cellule où ils se phosphorylent à l'extrémité 5' par

une kinase cellulaire. Le brin antisens du siARN est appelé brin guide. Il représente la séquence reconnue par le complexe RISC. Le brin sens est appelé le brin passager. Le complexe RISC contient Dicer, les protéines Argonaute (AGO1 et AGO2), TRBP (*TAR-RNA-binding protein*) et PACT qui est une protéine qui lie l'ARN double brin (Rana, 2007). Parmi les 8 membres de la famille des Argonaute chez l'Homme, seulement l'AGO2 est l'enzyme capable de cliver l'ARNm (Meister et al., 2004). Le complexe siRISC formé de RISC et du brin guide s'attache à l'ARN cible (Tang, 2005). L'ARN est clivé et silencé. Le clivage se fait entre les nucléotides 10 et 11 du siARN (Rana, 2007).

### 1.3.3 Conception des siARN

L'analyse des siARN extraits de *Drosophila melanogaster* montre que 50% des siARN sont doubles brins et ont 21-22 paires de bases (Elbashir, Lendeckel, & Tuschl, 2001). Les siARN actifs chez les cellules de mammifères ont généralement de 21 à 25 paires de bases (Elbashir, Harborth, et al., 2001). Ils peuvent être générés enzymatiquement ou synthétisés chimiquement (Amarzguioui, Rossi, & Kim, 2005). L'architecture des premiers siARN synthétisés est inspirée de la structure des séquences déjà existantes chez le *Drosophila melanogaster*. Les siARN les plus efficaces chez cette espèce sont ceux qui ont des bouts cohésifs formés d'une extrémité dépassante de deux nucléotides à chaque côté 3'. Plusieurs autres structures ont été utilisées par la suite : les siARN sans extrémité dépassante en 3' et les siARN avec extrémité dépassante en 3' dans le brin guide seulement. Ces structures ont aussi montré leur efficacité (Manoharan, 2004). Les siARN avec une structure en épingle à cheveux peuvent aussi inhiber l'expression des gènes en utilisant la machinerie d'ARNi (Harborth et al., 2003; Yu, DeRuiter, & Turner, 2002). Les siARN simples brins sont moins efficaces puisqu'ils sont plus dégradables par les nucléases (Martinez, Patkaniowska, Urlaub, Lührmann, & Tuschl, 2002). D'autres structures ont été développées pour inhiber les effets non spécifiques des siARN notamment les *small internally segmented siRNA* (Bramsen et al., 2007). Dans ce cas, le risque d'avoir des effets non spécifiques diminue puisque le brin passager des siARN est segmenté et par conséquent n'agit pas avec le complexe RISC (Behlke, 2008). Pour faciliter la synthèse chimique et pour avoir une structure secondaire optimale, la plupart des siARN synthétisés contiennent à peu près 50% de nucléotides G/C et sont dépourvus des successions de trois purines (Manoharan, 2004; Mocellin & Provenzano, 2004). Les siARN qui ont un faible appariement des 4 bases terminales dans le côté 5' du brin guide peuvent donner jusqu'à 87% de silencage (Khvorova, Reynolds, &

Jayasena, 2003; Reynolds et al., 2004). De plus, il est recommandé d'avoir dans le brin passager un G /C à la position 1, un A/U à la position 10 et 19 et plus que 3 A /U entre la position 13 et 19. Les positions 10 et 11 dans les siARN de 21 nucléotides, comptée à partir de l'extrémité 5' du brin guide, correspondent à la position du clivage de l'ARNm. L'incorporation du complexe RISC peut être améliorée par l'enrichissement en A /U de l'extrémité 3' du brin guide, spécifiquement à la position 19 (Jagla et al., 2005). Il existe d'autres caractéristiques qui sont liées à l'efficacité du silençage telles que la stabilité thermodynamique des siARN et la position de leur séquence complémentaire dans l'ARNm. Ceci est peut-être dû à la dépendance de la séquence au complexe RISC ou à la compétition de la liaison avec les facteurs protéiques (Manoharan, 2004). Le site cible doit être localisé après au moins 100 à 200 nucléotides du codon de l'initiation AUG et avant au moins 100 nucléotides du codon de terminaison. Il faut aussi éviter la région non traduite UTR (5'et3') puisque les protéines régulatrices peuvent empêcher la voie d'ARN interférence (Mocellin & Provenzano, 2004). Il existe plusieurs études dans lesquelles plusieurs variables et critères des siARN ont été testés afin de développer un arbre algorithmique qui aide à choisir les séquences des duplex (Amarzguioui & Prydz, 2004; Jagla et al., 2005). Les siARN choisis aléatoirement ont une efficacité faible (silençage de 39%) par rapport à ceux qui répondent à ces critères (60 à 73 % d'efficacité). Après le choix des siARN, il faut vérifier à l'aide du logiciel BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) si cette séquence n'est pas homologue avec d'autres séquences dans des gènes indésirables.

### **1.3.4 Les effets non spécifiques**

#### **1.3.4.1 L'activation du système immunitaire**

Dans la cellule, la présence des ARN doubles brins est attribuée à l'infection virale d'où l'activation du système immunitaire (Watts et al., 2008). Les siARN activent le système immunitaire par immunostimulation (Watts et al., 2008). Même les petites séquences d'ARN double brin (moins de 30 pb) peuvent activer le système immunitaire (Hornung et al., 2005). Il existe trois types d'immunorécepteurs qui reconnaissent l'ARN : les récepteurs Toll-like, la protéine kinase R (PKR) et les hélicases (RIG-1 et MDA5). Ces récepteurs peuvent être exprimés à la surface de la cellule, dans l'endosome ou dans le cytoplasme (Behlke, 2008; Watts et al., 2008). Judge et al., et Heil et al., ont montré que la séquence « UGUGU » est immunostimulatrice (Heil et al., 2004; Judge et al., 2005). De même, Hornung et al., ont identifié

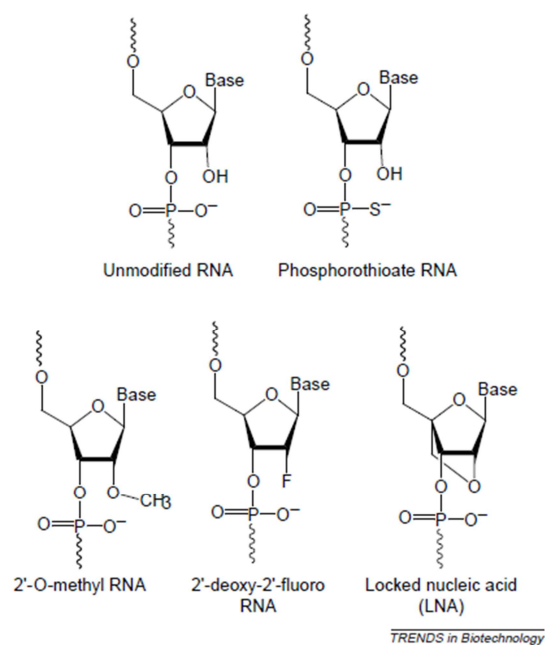
une autre séquence immunostimulatrice qui induit l'activité de l'interféron  $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) : « GUCCUCAA » (Hornung et al., 2005). Le récepteur TLR-7 peut reconnaître les séquences d'ARN riche en uracile (U) (Diebold et al., 2006). De plus, l'immunostimulation par RIG-1 peut avoir lieu en présence de bouts cohésifs ou de terminaisons 5'-triphosphate (Hornung et al., 2006; Marques et al., 2006; Watts et al., 2008).

#### **1.3.4.2 Silencage non spécifique d'ARN messagers**

Le silencage indésirable d'ARNm autre que la cible a été décrit pour la première fois par Jackson et al., après une analyse en utilisant les puces à ADN (Microarray) (Jackson et al., 2003). Cet effet peut être causé par une complémentarité de la région d'initiation (6-8 nucléotides à l'extrémité 5' du brin guide) du siARN avec l'ARNm du gène non désiré. Cet effet peut-être aussi causé par une complémentarité d'une autre région (~ 15 nucléotides) au centre du brin anti-sen du siARN avec un ARNm non cible (Jackson et al., 2003; Watts et al., 2008). L'effet non spécifique peut être due à une incorporation accidentelle du RISC avec le brin passager au lieu du brin guide (Behlke, 2008). Clark et al., ont montré que le brin passager du siARN spécifique au gène ICAM-1 a supprimé le gène TNF $\alpha$  (Clark, Pober, & Kluger, 2008). Il existe plusieurs méthodes pour réduire l'effet non spécifique des siARN comme l'optimisation de la conception des séquences (**section 1.3.3**), la modification chimique (**section 1.3.5**) ou bien l'utilisation d'un cocktail de 4 duplex de siARN différents qui ciblent différentes régions d'un même gène. Cette méthode permet de diluer l'effet non spécifique de chaque duplex. Cette stratégie est inspirée du clivage de l'ARN double brin naturels en plusieurs siARN qui ciblent le même gène, mais qui ont des effets non spécifiques différents (Watts et al., 2008).

#### **1.3.5 Modifications chimiques des siARN**

Les siARN peuvent être modifiés chimiquement au niveau des glucides, des nucléobases et/ou du squelette (**Figure 1-2**).



**Figure 1-2 : Les modifications chimiques des siARN (Paroo & Corey, 2004)**

### 1.3.5.1 Modification du squelette carboné

La modification de la liaison phosphate internucléotide est une approche pour augmenter la stabilité des siARN contre la dégradation des nucléases, mais elle peut altérer le comportement pharmacocinétique et l'affinité de la liaison non spécifique avec les protéines du sérum et des cellules (Behlke, 2008; Manoharan, 2004). La liaison phosphodiester est alors remplacée par une liaison phosphorothioate (remplacement de l'oxygène par un soufre), une liaison boranophosphate (boron), une liaison phosphoramidate (nitrogène) ou une liaison méthylphosphonate (méthyle). La modification phosphothioate peut ne pas altérer l'efficacité du silençage ou la réduire par rapport à l'efficacité du même siARN non modifié (Amarzguioui, Holen, Babaie, & Prydz, 2003; Chiu & Rana, 2003; Harborth et al., 2003). Il n'existe pas d'effets sur la biodistribution suite à cette modification. Par contre, des effets cytotoxiques ont été notés suite à une modification extensive des siARN (Watts et al., 2008). Les siARN modifiés par des liaisons phosphothioates peuvent se lier non spécifiquement à des protéines cellulaires indésirables (Behlke, 2008). Il existe d'autres études qui ne trouvent pas une amélioration de la stabilité de ces siARN modifiés en présence des nucléases (Braasch et al., 2003). L'efficacité et la toxicité des siARN modifiés dépendent de l'architecture de ces derniers, de la position des liaisons modifiées

et du nombre des liaisons modifiées (Watts et al., 2008). La modification boranophosphate améliore significativement la stabilité des siARN en présence des nucléases et donne un silençage de plus longue durée par rapport aux siARN non modifiés lorsque cette modification est dans les régions terminales. Elle améliore aussi l'efficacité du silençage par rapport aux siARN modifiés par des liaisons phosphotioates (Manoharan, 2004; Watts et al., 2008). En effet, ce type de modifications situées seulement dans le brin passager a bien inhibé l'activité de la protéine à fluorescence verte GFP (*Green Fluorescence Protein*) (Hall, Wan, Shaughnessy, Shaw, & Alexander, 2004). Par contre, il faut éviter de modifier le centre du duplex des siARN par des liaisons phosphotioates ou même par des liaisons boranophosphates (Manoharan, 2004; Schwarz, Tomari, & Zamore, 2004).

### 1.3.5.2 Modification des glucides

Généralement, la modification du 2'-OH n'affecte pas l'activité des siARN. Ce qui permet de modifier tous les sucres qui se trouvent dans la séquence du siARN à ce niveau (Watts et al., 2008). De plus, cette modification améliore la stabilité des siARN en augmentant la température de fusion ( $T_m$ ) (Manoharan, 2004). Le groupement 2'-OH peut être remplacé par 2'-H, 2'-OMe (méthyle), 2'-F (fluoro), 2'-NH<sub>2</sub>, 2'-O-MOE (méthoxyéthyle), LNA (*locked nucleic acid*), 2'-fluoro- $\beta$ -D-arabinonucleotide (FANA) et ENA (*ethylene-bridge nucleic acid*). La modification 2'-OMe se trouve dans des ARN naturels comme les ARN ribosomiaux et les ARN de transfert. Donc, elle n'est pas toxique (Behlke, 2008). Elle constitue la modification la plus populaire des siARN, car elle améliore l'affinité des liaisons et la stabilité en présence des nucléases. Plusieurs groupes montrent que cette modification diminue l'efficacité des siARN ou même l'inhibe totalement surtout dans le cas où plusieurs sucres sont modifiés dans la même séquence (Chiu & Rana, 2003; Choung, Kim, Kim, Park, & Choi, 2006; Santel et al., 2006). Par contre, elle a amélioré le silençage d'ARNm dans d'autres études (Manoharan, 2004). Deux ou trois résidus modifiés dans la séquence permettent aux siARN d'être moins immunostimulateurs et d'éviter d'activer le système immunitaire puisque les groupes 2'-OMe sont des inhibiteurs compétitifs de TLR-7 (Judge, Bola, Lee, & MacLachlan, 2006; Karikó, Buckstein, Ni, & Weissman, 2005; Robbins, Judge, Liang, & McClintock, 2007). Une modification 2'-OMe à la position +2 dans le brin guide diminue un autre effet non spécifique : les effets de la région d'initiation (Jackson et al., 2006). Elle peut être accompagnée d'autres modifications chimiques. La modification 2'-F permet une bonne résistance contre la dégradation par les nucléases des siARN sans activer le



système immunitaire *in vivo* et *in vitro*. La combinaison des deux modifications 2'-OMe et 2'-F donne un siARN très stable à la dégradation dans le sérum. Les siARN modifiés par 2'-F ne sont pas toxiques, mais il existe quelques résidus 2'-F qui ont été trouvés incorporés par la suite dans l'ADN endogène ou l'ARN de différents tissus (Behlke, 2008). La modification LNA améliore la résistance contre la dégradation des nucléases en augmentant la T<sub>m</sub>. En effet, cette modification permet de créer un pont entre l'oxygène 2'-O et le carbone 4'-C du ribose. Une modification extensive diminue significativement l'efficacité du silençage puisqu'elle change la conformation du siARN. Une incorporation limitée de cette modification est souvent efficace surtout au niveau des extrémités du brin passager et au niveau de l'extrémité 3' dépassante du brin guide (Behlke, 2008; Watts et al., 2008). La modification des extrémités dépassantes du siARN par 2'-H (remplacement des riboses à ce niveau par des désoxyriboses: ADN) confère une stabilité et une intégrité supérieures après une exposition de 48h au sérum (Choung et al., 2006). Il existe d'autres modifications au niveau du ribose comme 2'-MOE, 2'-NH<sub>2</sub>, FANA et ENA qui donnent une protection au siARN contre la dégradation par les nucléases tout en offrant d'autres propriétés comme l'augmentation de l'affinité et de l'efficacité (Behlke, 2008; Manoharan, 2004; Watts et al., 2008).

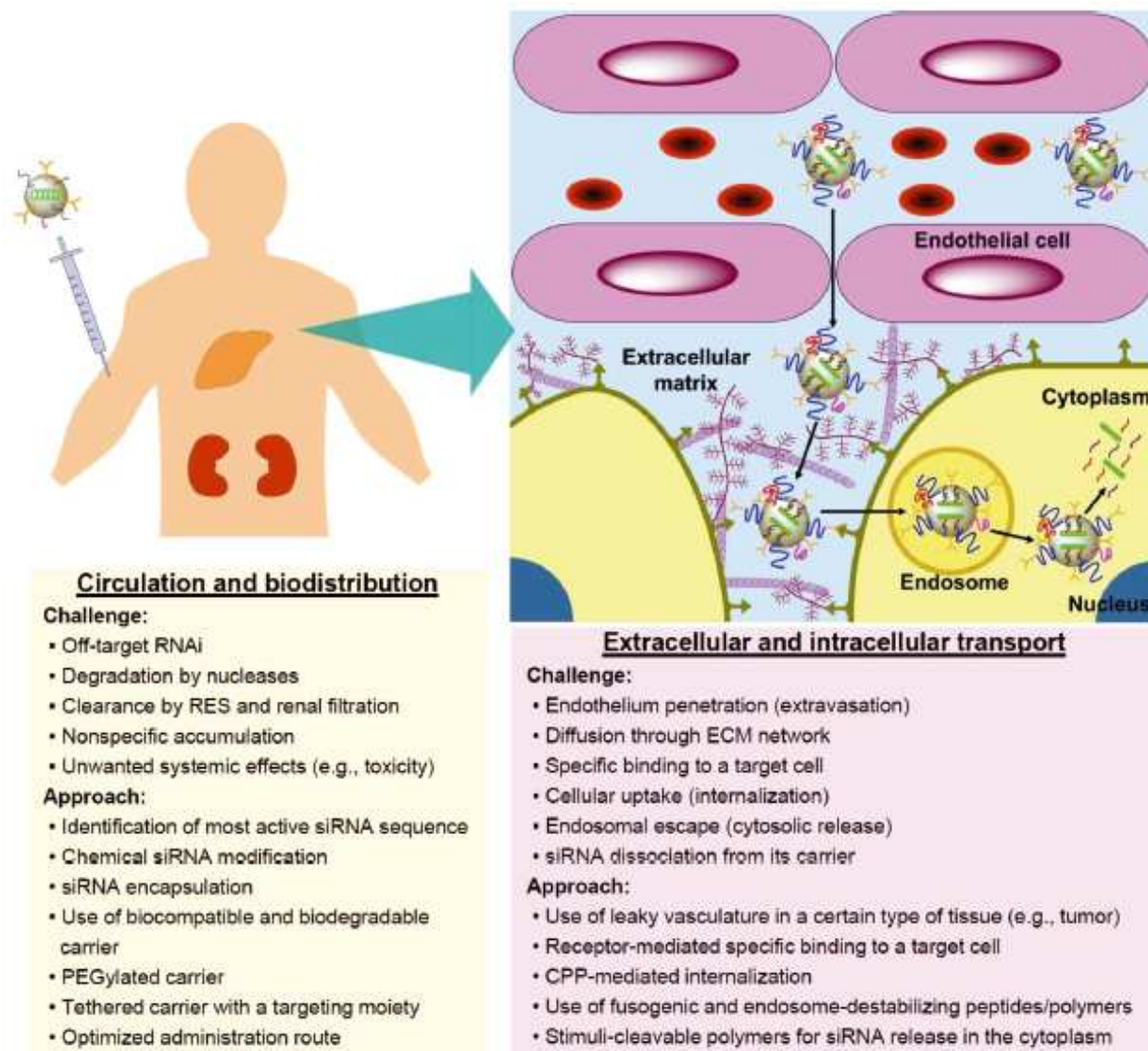
### 1.3.5.3 Modification des nucléobases

La plupart des modifications des nucléobases réduisent l'activité des siARN (Manoharan, 2004). Certaines modifications, telles que le remplacement de l'uridine par N-Me-uridine, inhibe totalement l'activité du duplex (Parrish, Fleenor, Xu, Mello, & Fire, 2000). Par contre, elles peuvent servir à stabiliser les paires de bases, comme dans le cas de la stabilisation des paires de bases A-U en remplaçant l'uracile (Ura) par 5-Br-Ura et 5-I-Ura et l'adénine par une diaminopurine (Chiu & Rana, 2003). D'autre part, il existe des modifications de nucléobases qui augmentent l'affinité des liaisons, l'efficacité et la spécificité comme le placement de 2-thiouracil dans l'extrémité 3' du brin guide. La 2-thiouracil peut aussi réduire l'activation du système immunitaire en inhibant l'immunostimulation par RIG-I et en réduisant les effets médiés par TLR-3 (Hornung et al., 2006; Karikó et al., 2005; Sipa et al., 2007).

## 1.4 Systèmes de livraison des siARN

Le défi associé à l'utilisation des siARN est de pouvoir les livrer en quantité suffisante dans le cytosol des cellules cibles. Les molécules de siARN livrées par voie systémique sont les plus

exposées à la dégradation par les nucléases physiologiques, l'élimination hépatique et l'élimination rénale (Watts et al., 2008). De plus, les siARN doivent diffuser à travers la matrice extracellulaire composée de protéine et de carbohydrates qui entoure la cellule cible et s'échapper de l'endosome qui peut les empêcher d'être livrés jusqu'au cytosole (Shim & Kwon, 2010). D'où la nécessité de développer des systèmes de livraisons, en plus de les protéger contre les nucléases, leur permettent de franchir les barrières et les obstacles extracellulaires et intracellulaires (**Figure 1-3**).



**Figure 1-3 : Les différents défis que peuvent rencontrer les siARN administrés par voie systémique (Shim & Kwon, 2010)**

### 1.4.1 Systèmes d'origine virale pour la livraison des siARN

Les vecteurs viraux recombinants contenant les siARN peuvent s'intégrer dans les cellules hôtes et libérer leur génome à l'intérieure (Rutz & Scheffold, 2004). Ils ont démontré leur efficacité de livrer les siARN jusqu'aux cellules cibles. Ils ont silencé significativement le gène-1 transformant la tumeur de l'hypophyse (*pituitary tumor transforming gene-1*) *in vitro* et *in vivo* (Jung et al., 2006). Le lentivirus a permis un silencage de 80% de la protéine GFP *in vitro*. De plus, les virus sont un bon système de livraison qui permet un silencage à long terme. En effet, l'utilisation du promoteur U6 a permis un silencage d'au moins 9 mois de la protéine GFP chez la souris (Mäkinen et al., 2006). Les vecteurs viraux sont très efficaces à livrer les siARN à l'intérieur de la cellule. Néanmoins, ils sont difficilement produits à grande échelle et peuvent être immunogènes (Glover et al., 2005; Shim & Kwon, 2010).

### 1.4.2 Conjugaison des siARN avec des stéroïdes ou des lipides

Le temps de circulation des siARN dans le sang est diminué suite à leur conjugaison avec des stéroïdes ou des lipides qui les rendent plus hydrophobes. Cette hydrophobicité permet une conjugaison avec les protéines du plasma et une meilleure liaison avec les membranes des cellules. Les siARN conjugués avec MMP (*membrane penetrating peptide*) peuvent facilement pénétrer dans la cellule. Cependant, ils se précipitent facilement et ils causent des effets non spécifiques (Watts et al., 2008). Soutschek et al., ont utilisé des siApoB (siARN ciblant le gène d'ApoB) qui ont été conjugués au cholestérol afin d'être livrés aux cellules du foie. Cette étude chez les souris a permis de créer une stratégie de livraison intraveineuse sélective qui vise seulement les hépatocytes. Les cholestérols-siARN s'incorporent avec les lipoprotéines et rentrent dans la cellule grâce aux processus médiés par des récepteurs (Shim & Kwon, 2010; Soutschek et al., 2004). De même, les siARN conjugués à un aptamer ont été livrés efficacement aux cellules cancéreuses de prostate qui surexpriment l'antigène membranaire spécifique au cancer de la prostate (Lupold, Hicke, Lin, & Coffey, 2002).

### 1.4.3 Liposomes et lipoplexes comme systèmes de livraison des siARN

Les liposomes se forment suite à l'accumulation de lipides. Ils ont des structures vésiculaires et des morphologies diverses. Ils sont utilisés pour protéger de nombreux types de biomolécules thérapeutiques puisqu'ils ne sont pas immunogènes et sont à faible coût. Il existe des liposomes cationiques, des liposomes neutres et des liposomes anioniques. Généralement, les liposomes qui

sont utilisés pour livrer les acides nucléiques sont les liposomes cationiques. Ils forment des polyplexes avec les ADN ou les ARN grâce aux forces de Van der Waals et les forces électrostatiques (Balazs & Godbey, 2010; Margineanu, 1987). Les SNALP (*stable nucleic acid-lipid particles*) sont des liposomes constitués de bicouche d'un mélange de lipides cationiques et de lipides fusogéniques revêtus de polyéthylène glycol (Rossi, 2005). Zimmermann et al., ont montré que les SNALP constituent un excellent outil pour la livraison systémique des siApoB et aussi le silençage du gène ApoB. L'efficacité de ce système de livraison a été étudiée chez les primates. En effet, les SNALP ont permis d'améliorer l'internalisation des siApoB aux cellules. L'utilisation des SNALP comme système de livraison des siARN ciblant l'ARNm ApoB a induit un silençage qui a duré 11 jours chez les singes avec une diminution importante du taux de cholestérol dans le sérum (Zimmermann et al., 2006). Les liposomes cationiques (Miyawaki-Shimizu et al., 2006) et les liposomes neutres (Landen et al., 2005) sont des systèmes de livraisons de siARN efficaces. Néanmoins, l'administration intraveineuse des liposomes cationiques/siARN contenant du DOTAP peut, selon Ma et al., activer le STAT1 et induire la réponse de type I et II de l'interféron (Ma et al., 2005). De plus, l'utilisation des liposomes *in vitro* peut affecter le métabolisme des cellules (Barreau, Dutertre, Paillard, & Osborne, 2006).

#### **1.4.4 Systèmes polymériques pour la livraison des siARN**

Les polymères utilisés pour la livraison des siARN sont polycationiques. Ils forment des complexes avec les acides nucléiques grâce à leurs charges opposées (Zhang et al., 2004). Plusieurs polymères ont livré efficacement les siARN jusqu'au cytoplasme des cellules cibles tels que le chitosane, le polyéthylèneimine (PEI) et la protamine (Choi et al., 2010; Howard et al., 2008; Urban-Klein, Werth, Abuharbeid, Czubyko, & Aigner, 2004). Les polymères synthétiques tels que le PEI et poly(l-lysine) (PLL) sont généralement toxiques lorsqu'ils sont administrés par voie systémique et à forte dose, car ils peuvent induire la nécrose et l'apoptose des cellules (Moghimi et al., 2005; Symonds et al., 2005). Leur conjugaison avec des polymères biocompatibles comme le polyéthylène glycol (PEG) peut diminuer cette toxicité. D'autre part, l'utilisation des polymères naturels et biocompatibles comme le chitosane est plus sécuritaire (Shim & Kwon, 2010).

## 1.5 Le chitosane

En 1859, Charles Rouget a désacétylé la chitine en milieu alcalin. Il a obtenu une substance soluble dans des solutions aqueuses acides (Kim, I. Y. et al., 2008). Cette substance a été nommée par la suite « chitosane » par Hoppe-Seyler (Hoppe-Seyler, 2006). Le chitosane a suscité un réel intérêt dans le domaine pharmaceutique. D'une part, la chitine, la composante principale d'exosquelette des arthropodes et de l'endosquelette des céphalopodes, est très abondante dans la nature. D'autre part, le groupement amine du chitosane confère à ce polymère plusieurs propriétés : la biodégradabilité, la biocompatibilité, la faible toxicité (DL50=16g/kg de poids corporel chez les souris), la faible immunogénicité et l'activité antibactérienne, antifongique, antivirale, antiacide et anti-ulcère (Agnihotri, Mallikarjuna, & Aminabhavi, 2004; Duceppe & Tabrizian, 2010; Hirano, 1999; Jayakumar, Nwe, Tokura, & Tamura, 2007; Kurita, 2006; Mourya & Inamdar, 2008; Nagpal, Singh, & Mishra, 2010; Pillai, Paul, & Sharma, 2009; Rinaudo, 2008; Rudzinski & Aminabhavi, 2010; Yi et al., 2005). De plus, il est hypocholestérolémiant (Ylitalo, Lehtinen, Wuolijoki, Ylitalo, & Lehtimäki, 2011). Le chitosane est un polysaccharide cationique linéaire formé d'unités N-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine liées entre elles par des liens  $\beta$ -(1-4) glycosidiques (Patel, Patel, & Patel, 2010). Il a été utilisé comme un système de livraison de l'ADNp (Jean, Alameh, Buschmann, & Merzouki, 2011; Nimesh, Thibault, Lavertu, & Buschmann, 2010; Thibault, M., Nimesh, Lavertu, & Buschmann, 2010) et des siARN (Alameh, Jean, DeJesus, Buschmann, & Merzouki, 2010; Holzerny et al., 2012; Howard et al., 2008; Howard et al., 2006; Jean, Alameh, De Jesus, et al., 2011; Katas & Alpar, 2006; Lee, D.W. et al., 2009; Liu, X. et al., 2007).

### 1.5.1 Production du chitosane

Le chitosane est produit à partir des carapaces des crustacés en 4 étapes : la déprotéinisation, la déminéralisation, la décoloration et la désacétylation (No & Meyers, 1995). Les carapaces des crustacés qui contiennent la chitine sont broyées en une poudre pulvérulente. L'hydroxyde de sodium (5%) sera ensuite rajouté pour dissoudre les protéines et les lipides à une température de 90°C. Ce processus s'appelle la déprotéinisation. L'étape qui suit est la déminéralisation dans une solution d'acide chlorhydrique. Le produit obtenu après le lavage et le séchage est la chitine. Le chitosane est le produit d'une désacétylation partielle de la chitine. Cette dernière est hydrolysée pendant 72 heures avec une solution d'hydroxyde de sodium (70%) à une température ambiante pour fournir le chitosane (Islama et al.; Thatte, 2004). Le chitosane ne diffère de la chitine que

par une désacétylation partielle qui donne naissance à des groupements amines ( $-\text{NH}_2$ ). Ces groupements se chargent positivement dans un milieu acide ( $-\text{NH}^{3+}$ ) conférant une nature cationique au chitosane (Park, J. W., Choi, & Park, 1983).

### 1.5.2 Propriétés physicochimiques du chitosane

Les propriétés physicochimiques du chitosane sont la masse moléculaire (MM) et le degré de désacétylation (DDA). La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton ( $^1\text{H}$  RMN) est une technique rapide et précise qui sert à déterminer le degré de désacétylation (DDA) du chitosane (Lavertu et al., 2003). La masse moléculaire (MM) est déterminée par chromatographie par perméation (GPC) (Lavertu, Méthot, Tran-Khanh, & Buschmann, 2006) ou par l'équation de Mark-Houwink :

$$[\eta] = KMa$$

$[\eta]$  étant la viscosité intrinsèque: elle est déterminée par l'équation de Huggins après une mesure avec un viscomètre capillaire.  $M$  est le poids moléculaire moyen en viscosité;  $K$  et  $a$  sont des constantes qui dépendent du type de polymère et du solvant (Islama et al.).

### 1.5.3 Formation des nanoparticules chitosane/siARN

Dans une solution acide, les groupements amines du chitosane ( $\text{NH}_2$ ) acquièrent une charge positive et se transforment en groupement ( $\text{NH}^{3+}$ ). Le chitosane est, par conséquent, protonné. Ce phénomène se passe lorsque la solution a un pH égal au  $\text{pK}_0$  (appelé aussi  $\text{pK}_a$  intrinsèque) du groupement ionisable. Pour le chitosane, le  $\text{pK}_0$  est égal à 6,5. Cette valeur est indépendante du DDA (Pillai et al., 2009). Les siARN polyanioniques forment spontanément des nanoparticules avec le chitosane cationique par attraction électrostatique. Le chitosane et les acides nucléiques peuvent se lier par des forces non électrostatiques, dans des conditions alcaline ou neutre, telles que les liaisons hydrogènes et les interactions hydrophobes. En effet, les siARN peuvent s'encapsuler dans la matrice du chitosane ou s'adsorber à sa surface (Mao, Sun, & Kissel, 2010).

### 1.5.4 Propriétés des nanoparticules chitosane/siARN

Les propriétés des nanoparticules chitosane/siARN sont le degré de désacétylation (DDA), la masse moléculaire (MM) et le ratio amine (chitosane) : phosphate (acides nucléiques) (N : P). Une nomenclature de la formulation de chitosane qui renseigne sur la combinaison de différents

paramètres est alors choisie : (DDA-MM-N : P). Différentes combinaisons ont été utilisées. Il a été montré que la stabilité des nanoparticules chitosane/siARN ou ADNp, l'efficacité de la livraison par le chitosane et le silençage dépendent de la combinaison (DDA-MM-N : P) choisie (Alameh et al., 2012; Katas & Alpar, 2006; Lavertu et al., 2006; Mao et al., 2010; Rudzinski & Aminabhavi, 2010).

La taille des nanoparticules chitosane/siARN dépend du ratio N : P. Elle augmente en diminuant le ratio N : P. Cela est peut-être dû à une possibilité d'agrégation ou à un pontage des siARN entre les chaînes du chitosane lorsque la quantité des acides nucléiques est plus élevée que le nombre des groupements amines (Howard et al., 2006). Katas et al. montrent que le ratio N : P élevé donne des particules de grande taille, dans le cas du chitosane hydrochloride et du chitosane glutamate. En outre, les particules qui sont de grandes tailles sont celles qui possèdent une MM la plus élevée (Katas & Alpar, 2006). Par contre, Holzerny et al. ne trouvent aucun effet du changement de ratio N : P ou de la MM sur la taille des nanoparticules ou sur le potentiel  $\zeta$  (Holzerny et al., 2012). Dans l'étude faite par Liu et al., plusieurs formulations de chitosane ont été utilisées avec un ratio N : P fixe égal à 50. Il a été montré que la taille des nanoparticules est très grande (~3500 nm) lorsque le DDA est élevé et la MM est petite (95-9-50). Les combinaisons avec DDA moyen et faible MM donnent des nanoparticules de l'ordre de 500 nm. Les autres formulations utilisées notamment 78-65-50, 84-114-50, 84-170-50 et 54-173-50 possèdent une taille proche de 200 nm (Liu, X. et al., 2007). La petite taille des nanoparticules est un critère crucial pour une livraison efficace des siARN (Kim, T. H. et al., 2007). En effet, les nanoparticules de taille plus grande que 250 nm sont phagocytées alors que les autres nanoparticules sont pinocytées (Bruce Alberts, 2002). Il existe d'autres études qui démontrent que la phagocytose concerne plutôt les particules de tailles plus grandes que 500 nm (Dobrovolskaia & McNeil, 2007; Zolnik, González-Fernández, Sadrieh, & Dobrovolskaia, 2010). De plus, les nanoparticules de taille de moins de 300 nm échappent au système réticuloendothélial du foie, des reins et des poumons (Kim, Y. et al., 2011). Selon plusieurs études, la taille optimale pour l'endocytose des nanoparticules chitosane/siARN est à l'entour de 100 nm (Rudzinski & Aminabhavi, 2010). La charge positive du chitosane dépende du ratio N : P, de la MM et du DDA. Lorsque le DDA est élevé, les nanoparticules sont stables. À des DDA faibles, les groupements acétyles volumineux et le manque de charges positives pourraient déstabiliser la complexation (Kim, I. Y. et al., 2008). Les nanoparticules de MM élevée ont une charge positive importante (Mao et al., 2010). L'internalisation des nanoparticules cationiques dans les

différentes cellules est plus efficace que celle des nanoparticules de charge neutre ou négative. En effet, l'interaction avec les protéoglycanes chargés négativement qui se trouvent à la surface des cellules facilite l'endocytose (Kwon, Standley, Goh, & Fréchet, 2005). La plupart des nanoparticules chitosane (non modifié)/siARN étudiées ont des potentiels  $\zeta$  positifs qui varient entre +10 et +30 mV (Holzerny et al., 2012; Howard et al., 2006; Liu, X. et al., 2007). En revanche, une forte charge positive pourrait être cytotoxique (Kwon et al., 2005). C'est pourquoi il faut trouver la formule qui pourrait maintenir une balance entre l'efficacité de livraison et la toxicité. La MM élevée donne une stabilité aux nanoparticules. De plus, les longues chaînes de la molécule du chitosane facilitent la formation des nanocomplexes en favorisant l'interaction entre le sucre des siARN et l'amine du chitosane. Liu et al., a indiqué que les nanoparticules avec chitosane de faible MM s'agrègent facilement puisqu'ils ne sont pas stables. La formulation qui a mieux silencé le gène EGFP (65%) chez les cellules vertes H1299 dans cette étude est (84-114-50) (Liu, X. et al., 2007). Les formulations de chitosane/siARN les plus efficaces selon Ji et al., sont celles avec un DDA et une MM élevés (Ji et al., 2009). En revanche, Techaarpornkul et al., ont montré que la MM faible pourrait être un bon critère pour la livraison des siARN puisque les nanocomplexes formés de chitosane possédant une MM élevée s'emmêlent facilement (Techaarpornkul et al., 2010). Fernandez et al., ont indiqué que le chitosane avec une MM de 25 kDa forme des complexes plus stables que le chitosane 10 kDa avec une faible toxicité (viabilité = 70%) (Fernandes et al., 2012). Le silençage du gène RecQL1 dans les cellules LS174T est de 80% en utilisant le chitosane 92-10-5. Cette même formulation a silencé le gène ApoB de 55% chez les cellules HepG2 (Alameh et al., 2012). Malmo et al., ont montré que l'efficacité de silençage des gènes *in vitro* dépend de plusieurs paramètres tels que la structure du chitosane, la concentration des siARN et la lignée cellulaire (Malmo, Sjørgård, Vårum, & Strand, 2011).

### **1.5.5 Modifications chimiques des nanoparticules à base de chitosane contenant les siARN**

Le chitosane est un système de livraison peu toxique, mais il a une efficacité de transfection faible par rapport à celle des autres systèmes de livraison notamment les lipides. De plus, il n'est pas spécifique aux cellules et il est peu soluble dans le sang (pH=7,4). Plusieurs études ont été faites pour améliorer ces caractéristiques. Dans ce but, plusieurs types de modifications chimiques ont été essayées telles que les modifications hydrophiliques, hydrophobiques et la sensibilisation au pH. Les modifications hydrophiliques ont pour but d'augmenter la solubilité



des nanoparticules dans le sang, puisque le chitosane n'est partiellement protonné qu'à un pH entre 6,3 et 6,5. L'insolubilité des nanoparticules peut causer des interactions non spécifiques avec des protéines sanguines comme l'albumine qui peut causer une agrégation et facilite la phagocytose (Kim, T. H. et al., 2007). Pour prolonger la durée de vie des nanoparticules dans le sang, une surface hydrophile a été créée avec l'accouplement du dextrane qui améliore la stabilité des nanocomplexes et inhibe leur agrégation, mais qui donne des particules de taille égale à  $200 \pm 56$  nm. C'est pourquoi Park et al., ont introduit au chitosane du polyéthylène glycol (PEG) et ont obtenu des nanoparticules stables et de petites tailles  $27,6 \pm 2,8$  nm (Park, I. et al., 2001; Park, Y. et al., 2000). L'ajout du polyvinyl pyrrolidone (PVP) permet d'inhiber l'interaction entre l'albumine et les nanocomplexes qui ont une taille ne dépassant pas les 23 nm (Park, I. K. et al., 2003). D'autres chercheurs ont modifié le chitosane pour le rendre soluble à une gamme de pH qui n'est pas restreinte. Kean et al. ont produit du chitosane triméthyle (TMC). Satoh et al. ont préparé le 6-amino-6-déoxychitosane soluble à pH neutre (Kean et al., 2005; Satoh et al., 2006). Les modifications hydrophobiques ont pour rôle d'améliorer l'internalisation des nanoparticules dans la cellule et faciliter leur libération par la suite (Kim, T. H. et al., 2007). Pour cette finalité, le chitosane a été modifié par l'acide déoxycholique (Kim, Y. H. et al., 2001; Lee, K., Kwon, Kim, Jo, & Jeong, 1998) et par l'acide 5 $\beta$ -cholannique (Sang Yoo, Eun Lee, Chung, Chan Kwon, & Young Jeong, 2005). Récemment, une charge négative a été incorporée dans le chitosane avec l'ajout de poly ( $\gamma$ -glutamic acid) ( $\gamma$ -PGA). Cette charge négative permet de faciliter la libération du siARN dans le cytoplasme sans altérer la stabilité des nanoparticules dans le sang. Cette modification a permis d'améliorer l'internalisation des nanoparticules et la prolongation du phénomène de silençage de l'expression du gène cible suite à une libération facile des siARN (Liao, Z. X. et al., 2010). Le galactose a été utilisé pour cibler surtout les hépatocytes parce qu'ils expriment beaucoup de récepteurs reconnaissant le galactose (Murata, Ohya, & Ouchi, 1997). Ce type de modifications a permis d'améliorer la transfection chez les cellules HepG2 par l'ADN en utilisant comme un système de livraison un chitosane de faible masse moléculaire ou du chitosane soluble dans l'eau (Gao et al., 2003; Kim, T. H., Park, Nah, Choi, & Cho, 2004). Fernands et al., ont conjugué le folate et le chitosane parce que les récepteurs de l'acide folique sont une cible sélective des médicaments qui traitent les maladies inflammatoires et le cancer puisqu'elles sont surexprimées seulement à la surface des macrophages actifs et les cellules malignes. Cette modification du chitosane a permis de réduire la taille des nanoparticules, de diminuer la toxicité, d'améliorer l'efficacité de transfection et de livrer les siARN aux cellules

cibles (Fernandes et al., 2012). Ghosn et al., ont introduit le groupement imidazole d'acide acétique dans le chitosane pour livrer les siARN ciblant l'ARNm de l'enzyme GAPDH dans les poumons administrés par voie intranasale. Cette modification a amélioré l'échappement endosomal et le silençage du gène (Ghosn et al., 2010).

### **1.5.6 Chitosane et siARN modifiés**

Plusieurs chercheurs ont utilisé des siARN modifiés transportés par différents systèmes de livraison à fin d'améliorer l'efficacité de silençage et la stabilité des nanoparticules *in vitro* (section 1.6.1) et *in vivo* (section 1.6.2). Par contre, peu de chercheurs ont étudié le comportement des nanoparticules chitosane/siARN modifiés. Howard et al. ont comparé, le chitosane/siARN non modifié et le chitosane/siARN modifiés par 2'-OMe dans les macrophages murins *in vitro* et *in vivo*. Les siARN non modifiés livrés par le chitosane sont plus efficaces que les siARN 2'-O-méthylés et ont mieux silençé le TNF $\alpha$ . Néanmoins, les nanoparticules chitosane/siARN modifiés causent moins d'effets hors cibles en particulier la réponse inflammatoire de l'interféron de type I (IFN) induite par l'interaction des siARN et le TLR-7 (*toll-like receptor*) (Howard et al., 2008). Glud et al., ont administré à des souris par voie intranasale des nanoparticules chitosane/siARN-EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) modifiés par LNA (*locked nucleic acid*). Le silençage était de 50%. Ces nanoparticules étaient d'une part, plus efficaces que les siLNA nus puisque le chitosane a des propriétés mucoadhésives et d'autre part, plus efficaces que les chitosane/siARN non modifiés (Glud et al., 2009). En guise de conclusion, la modification chimique peut améliorer ou diminuer l'efficacité des nanoparticules dépendamment des types des modifications utilisées et du système de livraison choisi. Par contre, l'utilisation des siARN modifiés est intéressante pour diminuer les effets hors cible et pour augmenter leur stabilité (Al-Qadi, Grenha, & Remuñán-López, 2012; Glud et al., 2009; Howard et al., 2008).

## **1.6 Silençage du gène ApoB *in vitro* et *in vivo***

### **1.6.1 Silençage du gène ApoB *in vitro***

Plusieurs séquences de siARN modifiées ou non modifiées ont été testées pour silençer le gène ApoB *in vitro*. Ces siARN ont été livrés par différents systèmes. L'efficacité de silençage est différente d'une étude à une autre et dépend de plusieurs facteurs. La plupart des cellules utilisées

pour étudier l'efficacité des siApoB sont les HepG2 (*liver hepatocellular cells*) puisque le traitement d'athérosclérose vise les cellules du foie qui sont, chez l'être humain, les seules cellules produisant l'ApoB-100. Soutschek et al. ont utilisé des siApoB modifiés. Le brin passager contient une seule liaison phosphotioate et le brin guide contient deux nucléotides modifiés par 2'OMe et deux liaisons phosphotioates. Les siARN sont conjugués ou non à une molécule de cholestérol. La séquence non conjuguée au cholestérol a donné un silençage supérieur à 70% des ARNm ApoB dans les cellules HepG2. L'efficacité du silençage des siARN conjugués au cholestérol est dose dépendante (Soutschek et al., 2004). Judge et al. ont utilisé des siARN 2'O-méthylés livrés par les SNALP. Le silençage du gène ApoB a atteint 70% tout en étant dose dépendant. La dose la plus forte utilisée est 45 nM (Judge et al., 2006). Rozema et al. ont comparé la transfectabilité des hépatocytes primaires murines par des siARN à l'aide du réactif commercialisé (siQUEST) et par des siARN polyconjugués. La technique des siARN polyconjugués dynamiques (*siRNA Dynamic PolyConjugates*) a été développée par ce groupe pour améliorer l'échappement endosomal. Les siARN sont conjugués avec un agent endosomolytique comme le poly (vinyl éther) qui contient des butyl et amino vinyl éthers (PBAVE) par des liaisons réversibles disulfures. Les groupements amines du PBAV sont protégés afin de lui conférer une activité endosomolytique sélective. Dans le milieu acide de l'endosome, ils sont démasqués et le PBAV devient actif. Le silençage des ARNm ApoB dans les cellules primaires d'hépatocytes par cette technique, de même par le siQUEST, est proche de 80% (Rozema et al., 2007). Burchard et al. ont transfecté les cellules murines Hepa 1-6 et les cellules humaines HUH et PLC/PRF15 par 10 nM de siApoB humains et murins modifiés livrés par le lipofectamine. L'efficacité de transfection est supérieure à 90% chez les cellules Hepa 1-6. Le but de leur étude est de comparer l'effet hors cible de ces séquences dans les cellules humaines et dans les cellules murines. À l'aide des puces à ADN (Microarray), ils ont trouvé que ces effets sont très différents entre les lignées. Cela est dû à la différence de l'appariement de la région d'initiation «seed region» avec les ARNm entre les espèces. Pour conclure, les souris ne sont pas un modèle fiable pour prédire les effets non spécifiques chez l'Homme (Burchard et al., 2009). McCarroll et al. ont aussi utilisé les cellules murines FL83B pour étudier le silençage causé par les siARN modifiés. Ils ont utilisé comme système de livraison les nanotubes fonctionnalisés avec des lipides et des acides aminés (TOT). Le silençage des ARNm est d'environ 90% avec un taux de mortalité faible (McCarroll, Baigude, Yang, & Rana, 2009).

### 1.6.2 Silençage du gène ApoB *in vivo*

Plusieurs études *in vivo* de silençage du gène ApoB, responsable du développement de l'athérosclérose, ont été faites dans le but de prouver l'efficacité d'un système de livraison, de la conception des siARN et/ou leur modifications chimiques en utilisant différents modèles animaux (Judge et al., 2006; Nishina et al., 2008; Rozema et al., 2007; Soutschek et al., 2004) (**Tableau 1.1 et Tableau 1.2**). D'autres études ont été réalisées pour développer une nouvelle technique plus précise que la PCR en temps réel et la 5'RACE pour détecter de façon spécifique le silençage des ARNm causé par la voie d'ARNi, comme la technique MBRACE dans l'étude de Lasham et al. (Lasham et al., 2010). L'administration systémique de 50 mg/kg de siApoB modifiés et conjugués avec des molécules de cholestérol pendant 3 jours consécutifs à des souris C57BL/6 diminue significativement le taux d'ARNm ApoB (Soutschek et al., 2004). Néanmoins, cette dose ne peut pas s'appliquer dans les études cliniques (Baigude, McCarroll, Yang, Swain, & Rana, 2007). Judge et al., ont réussi à silençer l'ApoB en utilisant le SNALP comme système de livraison chez les souris BABL/c avec une dose de 5mg/kg pendant 3 jours (Judge et al., 2006). Zimmermann et al. ont utilisé efficacement le même système chez les primates (Zimmermann et al., 2006). La conjugaison du siARN avec l' $\alpha$ -tocophérol en extrémité 5' du brin antisens à une dose de seulement 2 mg/kg a une efficacité équivalente à celle de 50 mg/kg de siARN conjugués au cholestérol *in vivo* (Li, L. & Shen, 2009; Nishina et al., 2008). Dans certaines études, des souris hémizygotés LDLr<sup>+/-</sup> CETP<sup>+/-</sup> ont été injectées avec une seule dose de 3 mg/kg de nanoparticules de siARN modifiés livrés par le liposome (Ason et al., 2011; Tadin-Strapps et al., 2011). La réduction de l'ARNm ApoB était supérieure à 90% et dure plus que 21 jours après l'administration du traitement contrairement au traitement avec l'oligonucléotide antisens (ASO) qui exige 2 injections par semaine pendant 4 à 6 semaines (Crooke et al., 2005; Tadin-Strapps et al., 2011). De même, l'effet de silençage des ARNm dans l'étude d'Alnylam Pharmaceuticals ne dure que 11 jours. Dans cette étude, les singes cynomologus ont été injectés par une seule dose de siARN (2,5mg/kg) encapsulés dans les SNALP (Zimmermann et al., 2006). Kenski et al. ont testé plusieurs types de modifications chimiques du siARN dans des nanoparticules de lipides. Ils ont administré 3 mg/kg à des souris C57BL/6 par voie intraveineuse. Ils ont trouvé que l'efficacité est maximale quand les modifications sont dans la position 8 et 15, en même temps, dans le brin guide (Kenski et al., 2012). Kang et al. ont étudié l'efficacité et la toxicité, chez des souris C57BL/6, de l'administration d'une combinaison de polymère cationique (PEI) avec des siARN modifiés. Ils ont injecté 25  $\mu$ g de siARN par souris par jour pendant 3 jours. Ils ont trouvé que la

livraison des siARN modifiés par le PEI diminue leur efficacité à silencer l'ARNm et diminue le taux du cholestérol total dans le sang. Ils ont développé un nouveau système de livraison des siARN modifiés injectés par voie intraveineuse composé de PEI modifié avec une masse moléculaire élevée appelé PEI-pullaln. Le PEI-pullalan a permis de diminuer les ARNm ApoB, le cholestérol total, le LDL, la toxicité et le taux de mortalité. De plus, les nanoparticules PEI-pullaln/siARN modifiés sont plus stables dans le sang et ont une haute capacité à cibler les cellules du foie puisque le pullalan, qui possède une forte affinité pour le récepteur d'asialoglycoprotéine hépatique, améliore la biodistribution (Kang, Tachibana, Obika, Harada-Shiba, & Yamaoka, 2012).

Tableau 1.1: Exemples documentés des études de silençage du gène ApoB *in vivo*

Systèmes de livraison	Acide nucléique et modification chimique	Modèles animaux	Doses/injection et fréquence des injections	Références
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sans système de livraison</li> <li>• siARN conjugués avec le cholestérol</li> </ul>	siARN, 2'OMe et liens phosphorothioates	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Souris C57BL/6</li> <li>• Souris transgénique hApoB</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 mg/kg</li> <li>• 1 injection/jour pendant 3 jours consécutifs</li> </ul>	(Soutschek et al., 2004)
	oligonucléotide anti-sense (ASO) (ISIS147764)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Souris C57BL/6J WT</li> <li>• Souris ApoE<sup>tmlunc</sup></li> <li>• Souris C57BL/6J-Ldlr<sup>tm1Her</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 à 50 mg/kg</li> <li>• 2 injections/semaine pendant 6 semaines</li> </ul>	(Crooke et al., 2005)
SNALP (Stable nucleic acid lipid particles)	siARN, 2'OMe et liens phosphorothioates	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Souris C57BL/6</li> <li>• Souris BALB/c</li> <li>• Singes Cynomologus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5, 2.5, 1 ou 0,5 mg/kg</li> <li>• 1 injection</li> <li>• 1 mg/kg</li> <li>• 1 injection</li> <li>• 1 ou 2.5 mg/kg</li> <li>• 1 injection</li> </ul>	(Zimmermann et al., 2006)

<b>Liposome</b>	siARN, 2'OMe	Souris BALB/c	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 mg/kg</li> <li>• 1 injection/jour pendant 3 jours consécutifs</li> </ul>	<b>(Judge et al., 2006)</b>
	siARN lipophile, 2'OMe et liens phosphorothioates	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Souris C57BL/6J WT</li> <li>• Souris C57BL/6J Ldlr<sup>-/-</sup></li> <li>• Souris FVB-SR-BI<sup>-/-</sup></li> <li>• Hamster syrien</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 mg/kg</li> <li>• 1 injection/jour pendant 3 jours consécutifs</li> </ul>	<b>(Wolfrum et al., 2007)</b>
<b>(PBAVE) (<i>amphipathic poly(vinylether) polymer</i>)</b>	siARN, 2'OMe et liens phosphorothioates	Souris C57BL/6	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2-2,5 mg/kg</li> <li>• 1 injection</li> </ul>	<b>(Rozema et al., 2007)</b>
<b>iNOP-7</b>	siARN, 2'F et squelette sulfate d'héparane	Souris C57BL/6	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 mg/kg</li> <li>• 1 injection/jour pendant 3 jours consécutifs</li> </ul>	<b>(Baigude et al., 2007)</b>
<b><math>\alpha</math>-tocopherol (vitamine E)</b>	siARN, 2'OMe et liens phosphorothioates	Souris BALB/c	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 mg/kg</li> <li>• 1 injection</li> </ul>	<b>(Nishina et al., 2008)</b>

<b>Lipidoïdes</b>	siARN, 2'OMe et liens phosphorothioates	Souris C57Bl/6	2, 3 et 5 mg/kg	<b>(Akinc et al., 2008)</b>
<b>Dendritic poly(L-lysine)</b>	siARN	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Souris C57BL/6J WT</li> <li>• Souris C57BL/6J-ApoE<sup>-/-</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,25, 1 et 2,5 mg/kg</li> <li>• 1 injection</li> </ul>	<b>(Watanabe et al., 2009)</b>
<b>Nanotubes à parois simples</b>	siARN, 2'F et squelette sulfate d'héparane	Souris C57BL/6	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,96 mg/kg</li> <li>• 1 injection</li> </ul>	<b>(McCarroll et al., 2009)</b>
	siARN	Souris CD-1 nus	50µg dans 1,8mL	<b>(Lasham et al., 2010)</b>
<b>Chitosane (86-130-40)-IAA-PEG-SVA</b>	Silencer <sup>®</sup> Select ApoB siRNA (Ambion)	Souris BALB/c	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1,5 mg/kg</li> <li>• 1 injection/jour pendant 2 jours consécutifs</li> </ul>	<b>(Ghosn et al., 2010)</b>



<b>LNP</b> ( <i>Lipid Nanoparticle</i> )	siARN, 2'déoxy, 2'F, 2'OMe, nucléotides abasiques inversés aux extrémités 5' et 3'	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Souris C57BL/6</li> <li>• Souris hémizygotes LDLr<sup>+/-</sup> CETP<sup>+/-</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3 mg/kg</li> <li>• 2 injections (1 injection jour 0 et 1 injection j14)</li> </ul>	(Ason et al., 2011)
<b>Nanoparticule d'or/cystéamine/siARN/PEI/HA</b>	siARN, 2'déoxy	Souris BALB/c	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,45, 0,90, et 1,8 nmol</li> <li>• 1 injection</li> </ul>	(Lee, M.-Y. et al., 2011)
<b>Nanoparticules d'acide hyaluronique et PEI</b>	siARN, 2'-déoxy	Souris BALB/c	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 30 µg</li> <li>• 1 injection</li> </ul>	(Park, K. et al., 2011)
<b>siARN encapsulés dans LNP</b>	siARN 2'Déoxy, 2' F, 2'OMe, iB ( <i>inverted deoxy abasic</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Souris BALB/c</li> <li>• Souris hémizygotes LDLr<sup>+/-</sup> CETP<sup>+/-</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3mgkg</li> <li>• 1injection</li> </ul>	(Tadin-Strapps et al., 2011)
	ASO, 2'MOe (ISIS147764)	Souris Ldlr <sup>-/-</sup> X C57BL/6J	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 25-100 mg/kg /semaine</li> <li>• 5 ou 10 semaines</li> </ul>	(Mullick et al., 2011)

<b>Chitosane</b>	siApoB1	Souris C57BL/6	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 mg/kg</li> <li>• 1 injection par jour pendant 3 jours consécutifs</li> </ul>	<b>(De Jesus, 2011)</b>
<b>Nanoaprticules de PBAVE modifié avec CDM (carboxy dimethylmaleic anhydride) complexé avec Chol-siARN</b>	siApoB, 2'-déoxy, 2'F, 2'OMe, et lien phosphorothioate	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Souris ICR femelle</li> <li>• Souris ASGPr (129 Asgr<sup>tm1Her</sup>)</li> <li>• Souris femelles B6.129S7-Ldlr<sup>tm1Her</sup></li> <li>• Souris C57B/6J sauvage WT (wild type)</li> </ul>	Volume de 0,3 mL	<b>(Wong et al., 2012)</b>
<b>NAG-PBAVE N-acétylgalactosamine complexé avec Chol-siARN</b>		Singes femelles	2 mg/kg	
<b>Lipid</b>	siARN, 2-OMe	Souris C57BL/6	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3 mg/kg</li> <li>• 1 injection</li> </ul>	<b>(Kenski et al., 2012)</b>

<b>AAV (adeno-associated virus vectors) exprimant shApoB ou miApoB (un taux élevé de l'expression des siApoB)</b>	AAV-shARN et AAV-miARN	Souris C57BL/6	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>1 \times 10^{11}</math>gc/souris (<math>\sim 4 \times 10^{12}</math> gc/kg) ou <math>5 \times 10^9</math></li> <li>• gc/souris (<math>\sim 2 \times 10^{10}</math> gc/kg)</li> </ul>	<b>(Maczuga et al., 2012)</b>
<b>Chol-siARN ou liposome-chol-siARN</b>	siARN	Souris C57BL/6 mâles	0,015mL/g	<b>(Nakayama et al., 2012)</b>
<b>Polymère Poly(amido amine disulfide) conjugué avec siARN et modifié par (CDM-GalNAc) et poly(éthylène glycol) (CDM-PEG)</b>	siARN, liens amil - amino; iB ( <i>inverted deoxy abasic</i> ), 2'F, 2' déoxy, 2' OMe, 2' Ribo, liens phosphorothioates	Souris CD-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3 mg/kg</li> <li>• 1 injection</li> </ul>	<b>(Parmar et al., 2013)</b>
<b>PAA (poly amido amine)</b>	siARN, 2'OMe, 2' F, 2'propagyl, 2'Ribo, liens phosphotioates, n-hexylamino	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Souris CD-1</li> <li>• Rats femelles Sprague-Dawley</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3 mg/kg</li> <li>• 1, 3 ou 6 mg/kg</li> </ul>	<b>(Parmar et al., 2014)</b>

<b>LNP</b>	siARN, 2' déoxy 2' F, 2'OMe, 2'Ribo, liens phosphotioates	Rats femelles Sprague–Dawley	1,0- 1,5 mL avec infusion de 3 mL/min	<b>(Xu et al., 2014)</b>
<b>Polymère conjugué</b>	siARN, liens aminés amil = hexyl, iB, 2' F, 2' déoxy, 2' OCH <sub>3</sub> , 2'Ribo, liens phosphorothioates	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Souris CD-1</li> <li>• Rats Sprague–Dawley</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,2 mL/souris</li> <li>• 5,6 mL/kg</li> </ul>	<b>(Guidry et al., 2014)</b>
<b>Polymère DM-Gal<sub>8</sub> et DM-Glu<sub>8</sub></b>	siARN, déoxy, extrémité dépassante dt-dt	Souris C57BL/6	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 200 pmol /souris</li> <li>• 2 injections</li> </ul>	<b>(Tachibana et al., 2014)</b>
<b>Polymère poly(l-ornithine:l-phenylalanine)</b>	siARN, iB, 2' F, 2' Déoxy, 2' OCH <sub>3</sub> et liens phosphorothioates	Rats Sprague-Dawley femelles	1, 3 ou 18 mg/kg	<b>(Barrett et al., 2014)</b>
<b>liposome cationique</b>	siARN, dt-dt	Souris C57BL/6 mâles	2,5 mg/kg	<b>(Li, Y. et al., 2014)</b>
<b>lipoplexe recouvert de polymère anionique</b>	siARN-Chol	Souris C57BL/6Cr femelles	50 µg	<b>(Hattori et al., 2014)</b>

**Tableau 1.2: Exemples documentés des souris utilisées pour les études de silençage du gène ApoB *in vivo* ainsi que les avantages et les inconvénients de leurs utilisations**

Souche de souris	Avantages pour les études de l'athérosclérose	Inconvénients pour les études de l'athérosclérose	Références
<b>C57BL/6</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La souche est très sensible, génétiquement, à l'athérosclérose.</li> <li>• La souche C57BL/6 a développé des lésions athéroscléreuses en 7 semaines, et ceux-ci continuent à croître jusqu'à avoir des grandes plaques d'athérome dans l'aorte et les artères coronaires.</li> <li>• La zone des lésions / sections aortiques est dans la gamme de 4500 à 8000 microns.</li> <li>• La souche est plus sensible à l'athérosclérose que les souris BALB/c.</li> <li>• Les souris ont un niveau de HDL moins important par rapport à celui chez les BALB/c.</li> <li>• Les souris C57BL/6 développent</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Les souris ne pourraient pas survivre en suivant les régimes athérogènes riches en matières grasses.</li> <li>• Les lésions sont très petites chez les souris de 4 à 5 mois d'âge.</li> <li>• Les lésions ne ressemblent pas aux lésions de l'athérosclérose humaine.</li> <li>• Les lésions causées par l'alimentation (repas du Paigen pour une période de 14 semaines à 9 mois) sont en grande partie limitées à la racine de l'aorte.</li> <li>• Les lésions ne sont pas reproductibles.</li> <li>• La plupart des souris n'ont pas eu de lésions.</li> <li>• Les lésions contiennent juste des macrophages chargés de lipides et</li> </ul>	<p><b>(Daugherty, 2002; Jawien, Nastalek, &amp; Korb, 2004; Liao, F. &amp; Andalibi, 1993; Paigen, Holmes, Mitchell, &amp; Albee, 1987; Paigen, Ishida, Verstuyft, Winters, &amp; Albee, 1990; Paigen, Mitchell, et al., 1987; Schreyer,</b></p>

	<p>l'athérosclérose suite à une diète riche en gras qui contient du cholestérol.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Une diète riche en gras induit l'expression de plusieurs gènes inflammatoires et le stress oxydatif.</li> </ul>	<p>n'évoluent pas au-delà de ce stade.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Le niveau de HDL est affecté par le sexe : Le niveau de HDL des souris femelles ayant suivi une diète riche en gras diminue de 50% par rapport aux souris mâles ayant la même diète.</li> <li>• Les souris femelles développent des lésions plus importantes que les souris mâles.</li> </ul>	<p><b>Wilson, &amp; LeBoeuf, 1998)</b></p>
<b>BALB/c</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Le régime athérogène provoque une baisse du HDL de 14 à 27% selon le sexe.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cette souche est résistante au développement de l'athérosclérose.</li> <li>• Le niveau de HDL chez les mâles est significativement plus élevé.</li> </ul>	<p><b>(Paigen, Holmes, et al., 1987; Paigen et al., 1990)</b></p>
<b>ApoE<sup>-/-</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Les souris sont hypercholestérolémique et développent des lésions artérielles spontanées.</li> <li>• Aucune différence de leur poids corporel par rapport à des souris normales.</li> <li>• Les animaux aussi jeunes (5-6 semaines d'âge) ont des adhérences de monocytes à la surface endothéliale de l'aorte.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dans des conditions alimentaires normales, la réduction de la protéine ApoE empêche le développement des anomalies du métabolisme lipidique.</li> <li>• Leurs lipides sériques sont faibles en particules de LDL contenant ApoB.</li> <li>• La rupture de la plaque et la thrombose ne se voit pas dans ce modèle.</li> </ul>	<p><b>(Daugherty, 2002; Hofker, van Vlijmen, &amp; Havekes, 1998; Jawien et al., 2004; Smith &amp; Breslow, 1997; Tadin-Strapps et</b></p>

al., 2011)

- Ils développent, en 6-10 semaines d'âge, des lésions avancées.
- Le taux du cholestérol total du plasma est élevé.
- Le niveau du cholestérol n'est pas affecté par l'âge ou le sexe des animaux.
- Le régime riche en gras permet d'avoir des lésions 3-4 fois plus grandes.
- Le modèle a une similitude histologique avec l'Homme.
- Les lésions sont similaires aux lésions humaines.
- Le modèle de souris présente une réponse à des signaux environnementaux qui ressemble à celle de l'Homme.
- Il peut être utilisé pour évaluer les thérapies qui pourraient bloquer l'athérogénèse ou la progression de la lésion.

- Les lésions évoluent vers une complexité intermédiaire (noyaux nécrotiques)
- Les souris ont les mêmes types de cellules observées dans les lésions humaines (macrophages, cellules T, les cellules du muscle lisse ...).
- Les lésions ne sont pas limitées à la racine de l'aorte.
- La taille des lésions dépend du régime alimentaire.

**Souris  
déficientes pour  
le récepteur  
LDL  
(LDL<sup>r-/-</sup>)**

- Les souris présentent des lésions athéroscléreuses similaires à celles chez l'Homme.
- Après un régime Paigen, le taux de cholestérol plasmatique de ces souris augmente jusqu'à 1 500 mg/dL, et de grandes lésions athéroscléreuses se forment.
- Ils développent des lésions tout au long de l'aorte.
- Ce modèle développe l'athérosclérose suite à un régime alimentaire riche en gras.
- Ces souris ont un taux de VLDL et de LDL plus élevé que celui chez les souris ApoE<sup>-/-</sup>.

**(Daugherty, 2002; Jawien et al., 2004; Smith & Breslow, 1997; Tadin-Strapps et al., 2011)**



<b>Souris transgénique pour l'ApoB-100 humaine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La souris transgénique ApoB est un modèle sensible au régime.</li> <li>• La présence accrue de l'ApoB dans le plasma des souris transgéniques pourrait conduire à l'athérosclérose accrue.</li> <li>• L'athérosclérose n'est observée qu'après un régime riche (le régime Paigen).</li> <li>• Ces souris ne synthétisent l'ApoB humaine que dans leur foie.</li> <li>• Les lésions formées présentent une morphologie simple qui se compose essentiellement de cellules spumeuses.</li> </ul>	<b>(Daugherty, 2002; Jawien et al., 2004)</b>
<b>LDLr<sup>-/-</sup> ApoE<sup>-/-</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ils développent une hyperlipidémie et l'athérosclérose sans une diète riche.</li> </ul>	<b>(Jawien et al., 2004)</b>
<b>ApoB transgenic LDLr<sup>-/-</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Les souris sont hyperlipidémiques.</li> <li>• Les lésions sont importantes et dans plusieurs régions vasculaires.</li> </ul>	<b>(Daugherty, 2002)</b>
<b>Ldlr<sup>+/-</sup> CETP<sup>+/-</sup> (human CEPT)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Un modèle qui a le même profil lipidique de l'Homme.</li> </ul>	<b>(Tadin-Strapps et al., 2011)</b>
<b>LDL<sup>-/-</sup>CEPT<sup>-/-</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• C'est un modèle pour l'hyperlipidémie humaine avec un niveau élevé de triglycérides, LDL et VLDL et un faible niveau de HDL.</li> </ul>	<b>(Smith &amp; Breslow, 1997)</b>

### **1.6.3 Silençage du gène ApoB avec les nanoparticules chitosane 92-10-5/siApoB**

Une étude de silençage génique de l'ApoB *in vivo* a déjà été faite dans notre laboratoire. Cette étude est une preuve de concept des effets thérapeutiques des nanoparticules chitosane/siApoB (De Jesus, 2011). Neuf groupes de souris C57BL/6 ont été utilisés. L'étude a commencé par une semaine d'acclimatation. Toutes les souris ont suivi une diète riche jusqu'à la fin de l'étude sauf le groupe contrôle des souris « saines ». Ce groupe n'a reçu aucun traitement. Les autres groupes se différencient entre eux par la période et la durée de la réception de traitement. Les groupes S1, S2, S3, S4, S5 ont reçu trois injections de nanoparticules chitosane/siApoB pendant trois jours consécutifs, mais dans des périodes différentes. Les souris S8 ont reçu une seule injection 48 heures avant l'euthanasie. Le deuxième groupe contrôle est le groupe des souris qui ont suivi une diète riche et n'ont reçu aucun traitement. Toutes les souris ont été euthanasiées en même temps pendant deux jours successifs. Plusieurs prélèvements sanguins ont été pris et le taux de l'ApoB a été dosé chez toutes les souris. L'analyse a montré que la diète riche a un effet remarquable sur le taux de l'ApoB dans le sang. De plus, le traitement avec les nanoparticules diminue l'ApoB dans le sang jusqu'à 30% par rapport aux souris qui ont suivi une diète riche sans être traitées. Par contre, cette diminution n'a pas été confirmée au niveau génomique (De Jesus, 2011).

## CHAPITRE 2 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

### 2.1 Objectif général

Le but de ce projet est d'étudier l'efficacité de plusieurs formules de chitosane *in vitro* et *in vivo* à livrer différents siARN (modifiés chimiquement ou non) spécifiques au gène ApoB. L'étude sert à choisir les nanoparticules les plus efficaces pour silencer *in vitro* le gène ApoB. Ces nanoparticules seront utilisées *in vivo* afin d'étudier l'efficacité du silençage du gène ApoB chez les souris C57BL/6 par des siARN livrés par le chitosane.

### 2.2 Objectifs spécifiques

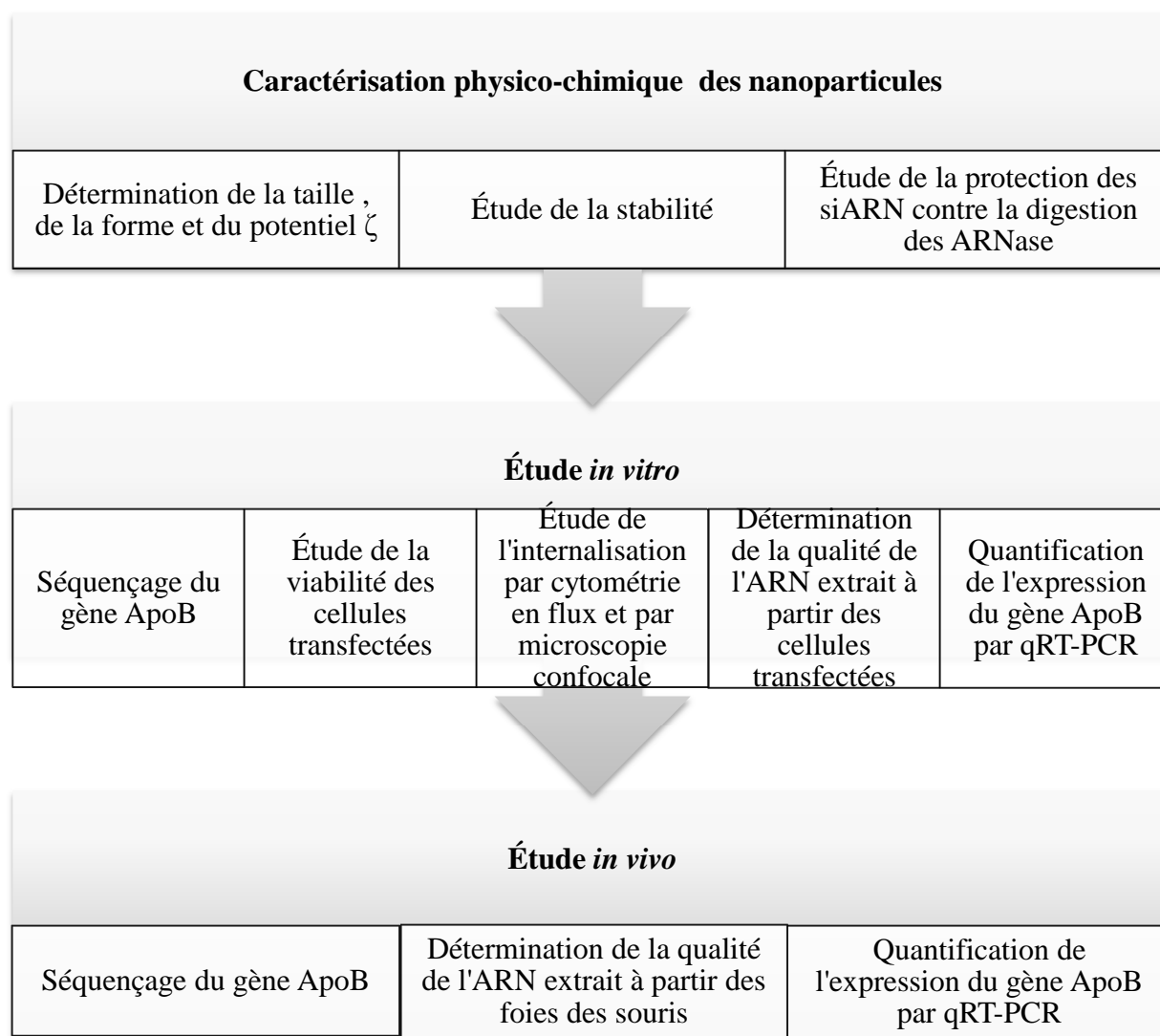
- Caractérisation physicochimique des nanoparticules formées par du chitosane et des siApoB modifiés et non modifiés.
- Détermination de la toxicité des nanoparticules chitosane/siARN *in vitro*.
- Optimisation du silençage du gène ApoB *in vitro* par l'utilisation des différents siARN avec ou sans modifications chimiques livrés par plusieurs formulations de chitosane.
- Étudier le silençage du gène ApoB par les nanoparticules chitosane 92-10-5/siApoB1 *in vivo*.

### 2.3 Les hypothèses scientifiques originales de la contribution à la recherche (HSOC)

Le chitosane peut complexer les siARN modifiés chimiquement et peuvent former ensemble des nanoparticules plus stables que les nanoparticules formées par des siApoB non modifiés. Cette hypothèse sera réfutée si les nanoparticules chitosane/siARN modifiés formées sont moins stables que les nanoparticules formées de siARN non modifiés. L'originalité de cette hypothèse est que l'étude physicochimique des nanoparticules chitosane/siARN modifiés n'a jamais été faite.

1. La modification chimique des siARN livrés par le chitosane augmente le silençage. Cette hypothèse sera rejetée si le silençage est plus faible ou égal à celui effectué par les siARN non modifiés. L'originalité de cette hypothèse est qu'il n'existe pas une étude comparative entre les siARN modifiés et non modifiés livrés par du chitosane non modifié.

2. Le chitosane est moins toxiques que les autres systèmes de livraison notamment le DharmaFECT<sup>®</sup>. Cette hypothèse est rejetée si le chitosane est plus toxique.
3. La modification chimique des siARN livrés par le chitosane diminue la toxicité. Cette hypothèse est rejetée s'ils sont plus toxiques que les siApoB non modifiés.
4. Le chitosane 92-10-5 peut livrer par voie intraveineuse les siARN jusqu'au foie et les libérer au sein des cellules afin de silencer le gène ApoB. Cette hypothèse est rejetée si les souris malades traitées ont un taux d'ARNm ApoB plus élevé que les souris normales. L'originalité de cette hypothèse est que peu d'études ont utilisé le chitosane non modifié pour livrer les siARN par voie intraveineuse.



**Figure 2-1: Organisation du projet de recherche**

## CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE

### 3.1 Choix et synthèse des siApoB

Les séquences des siApoB ont été synthétisées par la compagnie Dharmacon (Thermo Fisher Scientific, Dharmacon RNAi Technologies, Lafayette, CO., USA) par synthèse chimique 2'-ACE ARN. Les siApoB1 ont été mis au point par Alnylam pharmaceuticals et ont été utilisés par Watanabe et al. et Zimmermann et al. (Watanabe et al., 2009; Zimmermann et al., 2006). Cette séquence peut cibler les ARNm de l'ApoB humain et murin. Les siApoB2, étudiés par Soustchek et al., ont la même séquence que siApoB1, mais ils sont légèrement modifiés chimiquement (Soustchek, 2004). Les siApoB3 contiennent plus de modifications chimiques et ont une séquence différente. Ils sont choisis de façon à cibler les ARNm de l'ApoB humain, murin et des singes cynomolgus. L'efficacité des siApoB3 a été démontrée *in vitro*, chez les souris et aussi chez les primates (Zimmermann., 2006). Les siApoB1 et siApoB2 ont été marqués par le fluorochrome 6-FAM pour l'étude par cytométrie en flux. Pour la microscopie confocale, les siARN utilisés sont les siGLO verts qui sont des duplex d'oligonucléotides marqués par le fluorophore 6-FAM. Les siGLO sont des indicateurs visuels de transfection chez les cellules de mammifères (Dharmacon, 2014). Le contrôle négatif de silençage utilisé *in vitro* sont les siARN leurres qui ne sont spécifiques à aucune séquence d'ARNm humain. Les différents siApoB utilisés sont présentés dans le **tableau 3.1**.

**Tableau 3.1: Les différentes séquences de siApoB utilisées**

Nom du siARN	Brin	Séquence
<b>siApoB1</b>	Sens	5'-GUCAUCACACUGAAUACCAAU-3'
	Antisens	5'-AUUGGUAUUCAGUGUGAUGACAC-3'
<b>siApoB2</b>	Sens	5'-GUCAUCACACUGAAUACCAA*U-3'
	Antisens	5'- -AUUGGUAUUCAGUGUGAUGAc*a*C-3'
<b>siApoB3</b>	Sens	5'-GGAAUCuuAuAuuuGAUCcA*A-3'
	Antisens	5'-uuGGAUcAAuAuAAGAuUCc*c*U-3'

Les nucléotides modifiés par 2'O-méthylation sont en minuscule et les liaisons phosphorothioates sont représentées par des astérisques.

### 3.2 Préparation du chitosane

Les chitosanes ayant des DDA de 80 et 92 choisis pour cette étude sont dépolymérisés en présence de l'acide nitrique pour obtenir des masses moléculaires moyennes en nombre égales à 10 et 40 (Mn) (Lavertu et al., 2006). En général, le polymère n'a pas une seule masse moléculaire, mais plutôt une distribution de masse moléculaire (MM). La MM est généralement exprimée par Mn (masse moléculaire moyenne en nombre) ou Mw (masse moléculaire moyenne en masse). La Mn qui est égale au rapport de la somme totale des masses de toutes les particules de la solution sur le nombre des particules donne une idée sur les propriétés qui ne dépendent que du nombre de nanoparticules et ne dépendent pas de leurs tailles, notamment les propriétés colligatives. Le rapport de Mw sur Mn est appelé l'index de polydispersité (PDI). Le PDI est égal à 1 lorsque le polymère est monodisperse. Sinon, il est inférieur à 1 (Nairn, 2007). La Mn et la Mw sont déterminées par chromatographie par perméation sur gel (GPC: *gel permeation chromatography*). Il indique, dans un lot de chitosane, la distribution des masses moléculaires. La dépolymérisation de chitosane débute par leur dissolution pendant une nuit dans 50 mM d'acide

hydrochlorique à 0.5 % (masse/volume) sous une agitation magnétique. Ensuite, ils sont traités par des quantités spécifiques de nitrite de sodium pendant 16 heures. La réaction est arrêtée par précipitation en ajoutant le NaOH. Après plusieurs lavages par centrifugations, les précipités de chitosane sont dissous dans l'eau désionisée (Lavertu, 2006). Les échantillons sont caractérisés, après leur lyophilisation, et le DDA des chitosanes est déterminé par  $^1\text{H}$  NMR, une technique précise avec un coefficient de variation moins de 0.8% (Lavertu, 2003). Le chitosane marqué à la rhodamine B isothiocyanate (RITC) fluorescente (chitosane-Rho) (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada) a été utilisé pour effectuer l'étude de l'internalisation des nanoparticules chitosane/siApoB par microscopie confocale. Les différents chitosanes utilisés sont présentés dans le **tableau 3.2**.

**Tableau 3.2: Les différentes formulations de chitosane utilisées**

Chitosane	DDA [%]	Mn [kDa]	Mw [kDa]	PDI
<b>80-10</b>	84,4	10,83	14,52	1,34
<b>80-40</b>	82,5	38,37	53,41	1,39
<b>92-10</b>	92	8,973	13,64	1,52
	92,7	7,59	11,22	1,48
<b>92-40</b>	92,7	40,7	59,01	1,45
<b>92-10-Rho</b>	92	10	10	1,4
<b>80-10-Rho</b>	80	12,4	22,41	1,8

### 3.3 Formation des nanoparticules chitosane/siARN

Le chitosane a été dissous dans l'acide chlorhydrique une nuit à température de la pièce à 0,5% (p/v). Le ratio glucosamine:HCl est 1:1. Ensuite, cette solution stock a été filtrée afin de la

stériliser et la diluer selon le ratio N : P désiré en tenant compte de la concentration des siARN utilisés. Après la dilution des siARN, un volume de chitosane a été ajouté au même volume de siARN dans un tube eppendorf. La complexation a été faite par pipetage. Les nanoparticules ont été utilisées 30 minutes après une incubation à température ambiante (Lavertu et al., 2006).

### **3.4 Caractérisation physicochimique des nanoparticules chitosane/siApoB**

#### **3.4.1 Détermination de la taille, du potentiel $\zeta$ et de l'indice de polydispersité des nanoparticules**

L'appareil Zetasizer Nano ZS (DLS, Malvern Zetasizer Nano ZS, Malvern, Worcestershire, UK) a été utilisé pour mesurer la taille, le PDI et le potentiel  $\zeta$  des nanoparticules chitosane/siApoB. De prime abord, les nanoparticules ont été préparées à une concentration finale de siARN égale à 0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Ensuite, elles ont été diluées (1 :10) dans une solution de 10 mM de NaCl pour mesurer la taille et déterminer le PDI. La diffusion dynamique de la lumière (DLS : *Dynamic Light Scattering*) est une technique qui permet de déterminer la taille des nanoparticules. Les nanoparticules chitosane/siApoB en mouvement brownien dans la solution sont bombardées par un faisceau monochromatique (un laser) à un angle de  $173^\circ$  à  $25^\circ\text{C}$ . La lumière change de longueur d'onde en fonction de la taille des nanoparticules. Une fonction d'autocorrélation ainsi que le coefficient de diffusion ont été utilisés pour déterminer la taille des nanoparticules (Malvern, 2013). Chaque échantillon a été préparé en triplicata. Des mesures de 15 séries ont été répétées 3 fois pour chaque échantillon de 500  $\mu\text{L}$  dans la cuvette (759075D, Plastibrand®, Brand, Wertheim, Allemagne). La détermination de la taille des nanoparticules chitosane/siApoB permet de prédire leur comportement avec les composants du système immunitaire et leur interaction avec les différentes barrières biologiques.

L'intensité de la répulsion ou de l'attraction électrostatique entre les particules dans une solution est appelée le potentiel  $\zeta$ . Il est nécessaire pour étudier la stabilité des nanoparticules (Malvern Instruments, 2013). Afin de déterminer le potentiel  $\zeta$  des nanoparticules, la solution utilisée précédemment a été diluée deux fois en ajoutant 500  $\mu\text{L}$  de NaCl 10mM. La cuvette utilisée dans cette étape est la cellule capillaire (DTS1061, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Le volume mis dans cette cuvette est 1000  $\mu\text{L}$ .



### **3.4.2 Analyse de la morphologie des nanoparticules chitosane/siApoB par microscopie électronique à balayage environnemental (ESEM)**

Des nanoparticules chitosane/siApoB ont été préparées afin de les visualiser par ESEM. La concentration des siApoB1, siApoB2 et siApoB3 utilisée est  $0,05 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . La solution du chitosane stock utilisée était préparée la veille. Deux formulations de chitosane ont été choisies pour cette expérience (92-10-5 et 92-40-5). Elles ont été complexées avec les trois différents siARN. Le but de cette expérience qualitative est de confirmer les résultats de DLS et d'étudier la morphologie des nanoparticules obtenues. Le mode sous vide élevé (High Vacuum) a été utilisé pour observer les échantillons.

### **3.4.3 Étude de stabilité des nanoparticules chitosane/siApoB en fonction du temps**

La stabilité des nanoparticules à base des siApoB complexés avec différentes formulations de chitosane à plusieurs temps d'incubation a été étudiée. Cette expérience permet de comparer la stabilité des nanoparticules afin de sélectionner les meilleures pour les études qui suivent. Les nanoparticules ont été préparées et ont été incubées, tel que décrit dans la **section 3.3**, à une concentration de siARN finale égale à  $0,025 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Entre temps, une solution d'acide 2-(morpholin-4-yl) éthanesulfonique 2X (MES) a été préparée. Elle contenait 20 mM MES et 8 mM d'acétate de sodium. Le pH de la solution a été ensuite ajusté à 6,5. Un volume de  $30 \mu\text{L}$  de MES a été ajouté à  $30 \mu\text{L}$  de nanoparticules. La concentration finale du MES était alors 1X. Les nanoparticules ont été incubées à pH 6,5, pKa du chitosane et pH de l'endosome, pendant 30 minutes, 4 ou 20 heures. Elles ont été ensuite diluées avec le MES à 1 :100 avec un volume total de  $500 \mu\text{L}$  pour être dans la gamme faible de détection du RiboGreen<sup>®</sup>, utilisé pour détecter l'ARN libre non complexé. Cette gamme varie entre  $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$  et  $500 \text{ ng}/\mu\text{L}$ . Pour cette gamme, le RiboGreen<sup>®</sup> doit être dilué 2000 fois dans du TE. Un volume de  $100 \mu\text{L}$  de RiboGreen<sup>®</sup> a été ajouté à  $100 \mu\text{L}$  de la solution de nanoparticules. Tous les échantillons étaient préparés en triplicata. Le contrôle négatif utilisé était les siARN non complexés. Le RiboGreen<sup>®</sup> était incubé avec les nanoparticules pendant 5 min. La lecture de la fluorescence de plaque de 96 puits qui contient tous les échantillons a été réalisée en utilisant Tecan Infinite<sup>®</sup> 200 à des longueurs d'ondes 485nm/535nm.

### 3.4.4 Étude de protection des siApoB par le chitosane contre la digestion des ARNase

Le but de cette expérience est d'étudier la résistance des siARN protégés par le chitosane à la dégradation dans une solution qui contient une concentration d'ARNase presque égale à la concentration physiologique d'un individu normal. En effet, la concentration de l'ARNase dans le sang est entre 0,180 et 0,240  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Levy & Rottino, 1960). De plus, cette étude permet de comparer les 3 siApoB nus modifiés et non modifiés et aussi les siApoB complexés avec le chitosane. En effet, l'interaction des siARN modifiés avec le chitosane est inexplorée. Le chitosane choisi pour cette expérience est le 92-10-5. Les contrôles positifs utilisés sont les siARN nus sans chitosane et sans ARNase. Les contrôles négatifs sont les siARN nus avec ARNase à la plus forte concentration. Les nanoparticules sont préparées à une concentration de siARN égale à 0,025  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Elles sont incubées 30 minutes à température ambiante. Dans chaque tube, 5  $\mu\text{L}$  de nanoparticules ont été ajoutés à 5  $\mu\text{L}$  de MES à pH 6,5 et de concentration 4X. Les nanoparticules ont été ensuite incubées à différentes concentrations finales d'ARNase soit 0, 0,01, 0,05 et 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  pendant 30 minutes, 1, 4 et 24 heures. La concentration finale de MES après l'ajout de l'ARNase était alors égale à 1X. Pour désactiver l'ARNase, deux unités d'ARNase OUT ont été ajoutées à chaque échantillon. En effet, une unité dégrade 2  $\mu\text{g}$  d'ARNase. Les tubes ont été incubés à 25 °C pendant 10 minutes. Afin d'étudier l'intégrité des siARN, le chitosane a été digéré avec 0,5  $\mu\text{L}$  de chitosanase [10mU/ $\mu\text{L}$ ]. Les échantillons ont été incubés à 37 °C pendant 60 minutes. Enfin, pour désactiver la chitosanase, tous les tubes ont été incubés à -20 °C pendant 1 heure. Les échantillons ont été ensuite dilués afin d'être dans la gamme de lecture de RiboGreen<sup>®</sup>. Pour ce, 4  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon ont été ajoutés à 496  $\mu\text{L}$  de MES 1X. Chaque puits de la plaque contenait 100  $\mu\text{L}$  de l'échantillon. Tous les échantillons ont été préparés en triplicata. La lecture de la fluorescence a été réalisée en utilisant Tecan Infinite<sup>®</sup> 200 à des longueurs d'ondes 485 nm/535 nm.

## 3.5 Étude *in vitro*

### 3.5.1 Culture cellulaire

Les cellules HepG2 ont été cultivées dans du milieu essentiel minimum d'Eagle complet (EMEM: *Eagle's minimal essential medium*) (30-2003, ATCC, Manassas, VA, USA) qui contient 10 % de sérum foetal de boeuf (FBS : *fetal bovine serum*) (26140079, Gibco, Invitrogen,

Carlsbad, CA, USA) et elles ont été conservées à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules HepG2 ont été choisies pour cette étude *in vitro* puisqu'elles sont les plus utilisées dans la littérature pour les études de silençage de l'ApoB.

### 3.5.2 Séquençage du gène ApoB

Le séquençage du gène ApoB à partir des cellules HepG2 est crucial pour déterminer si les cellules expriment ce gène, s'il existe des mutations et si les siApoB choisis y sont compatibles. Les mutations peuvent empêcher l'appariement et le silençage. Les cellules ont étéensemencées dans deux puits d'une plaque de 24. L'ARN total (ARNt) a été extrait à l'aide du kit Nucleospin XS (section 3.5.7). Les ARNm ont été rétrotranscrits en ADN complémentaire (ADNc) par RT-PCR (section 3.5.9).

#### 3.5.2.1 Amplification des parties qui délimitent les siApoB par PCR

L'ADNc obtenu par transcription inverse des régions de l'ARNm ApoB a été ensuite amplifié par PCR. Pour chaque réaction, un volume de 1,5 µL d'ADNc a été ajouté dans un volume réactionnel final de 50 µL contenant 25 µL de tampon 2X (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM), 1 µL du mélange de dNTP à une concentration de 10 mM, 1 µL de l'amorce sens, 1 µL de l'amorce antisens à une concentration de 20mM et 0,75 µL de l'enzyme Taq polymérase. Deux couples d'amorces ont été utilisés. Le premier couple (**Amorce 1**) délimite la région qui contient la séquence complémentaire des siApoB1 et siApoB2. Le deuxième couple (**Amorce2**) délimite la région qui contient la séquence complémentaire des siApoB3.

**Tableau 3.3 : Les séquences des couples d'amorces utilisés pour l'amplification des parties qui délimitent les siApoB par PCR**

	Sens	Antisens
<b>Amorce 1</b>	CATCATTAGAGCTGCCAGTCC	AATTTGGGCTTTTGTGGTTG
<b>Amorce 2</b>	AGGAGTCCTTCACAGGCAGA	TTCCCAAAAAGAGCTTCCAA

La réaction de l'amplification de l'ADN a été précédée par une dénaturation de 5 minutes à 95 °C. Un cycle de dénaturation (30 secondes, 95 °C), hybridation (30 secondes, 55 °C) et élongation (1 minute, 72 °C) a été répété 30 fois. Le dernier cycle a été suivi d'une étape d'extension de 5 minutes à 72 °C. Le produit de la PCR a été migré sur gel d'agarose 1%.

### **3.5.2.2 Extraction des produits de PCR**

Les bandes ont été purifiées en utilisant un le kit QIAquick Gel Extraction de Qiagen. Chaque bande a été excisée avec un scalpel. La tranche du gel a été pesée. Trois volumes du tampon QG ont été ajoutés à chaque volume du gel dans un tube eppendorf. Le tube a été incubé à 50 °C pendant 10 minutes tout en le vortexant à chaque 3 minutes. Un volume d'alcool isopropylique égale au volume du gel a été ajouté par la suite. Le mélange a été mis dans une colonne QIAquick spin placée dans un tube collecteur. Une centrifugation d'une minute a été appliquée. La colonne a été lavée en ajoutant 0,75 mL du tampon PE et en centrifugeant pendant une minute. Pour éluer l'ADN, la colonne a été placée dans un nouveau tube de 1,5 mL et un volume de 50 µL du Buffer EB (10 mM Tris·Cl, pH 8,5) a été ajouté. Le tube a été centrifugé pendant une minute.

### **3.5.2.3 Séquençage et analyses des produits de PCR**

Les produits des deux PCR ont été séquencés par la technique de Sanger (Sanger, 1977) (service de séquençage de l'institut de recherche en immunologie et en cancérologie :IRIC). Les deux couples d'amorces utilisées au cours des PCR ont été aussi utilisés pour le séquençage (amorce 1 et amorce2) (**Tableau 3.3**). Le logiciel « Gene Work 2.5 » (Intelligenetics, USA) a permis l'analyse des séquences générées. La référence de la séquence utilisée est la référence NCBI (NM\_000384.2). La séquence en acides aminés a été déduite de la séquence générée.

## **3.5.3 Transfection des cellules HepG2**

### **3.5.3.1 Transfection par chitosane/siARN**

Le milieu de transfection utilisé est le DMEM à glucose élevé (12100-046, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) qui contient 5 mM de MES et 10 mM de NaHCO<sub>3</sub> et 10% de FBS. Il est préparé la veille de l'expérience. Son pH doit être ajusté à 6,5 lors de sa préparation et doit être vérifié avant la transfection. Le milieu est incubé à 37 °C et 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture des cellulesensemencées dans une plaque de 24 ou 96 puits est aspiré et remplacé avec 500 ou 100 µL de milieu de transfection respectivement. Les nanoparticules chitosane/siARN sont

ajoutées. La concentration finale des siARN par puits est égale à 100 nM. La plaque est incubée 24 heures à 37 °C et à 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.5.3.2 Transfection par DharmaFECT®/siARN

La transfection des cellules HepG2 par DharmaFECT® a été faite selon les spécifications du manufacturier. La concentration des siARN est 100 nM/puits. (Thermo Fisher Scientific, Dharmacon RNAi Technologies, Lafayette, CO., USA). Dharmacon recommande d'utiliser DharmaFECT1® ou DharmaFECT4® pour transfecter les cellules HepG2. Pour chaque triplicata, deux tubes ont été préparés. Le premier tube contenait des siARN dilués avec du milieu de culture des cellules sans FBS. Le deuxième tube contenait DharmaFECT4® dilué dans EMEM sans FBS. Après une incubation qui dure 5 minutes à température ambiante, le contenu du premier tube a été ajouté dans le deuxième tube. Après une incubation de 20 minutes, du milieu avec FBS a été ajouté pour un total de 1500 µL pour les cellules dans la plaque de 24 puits et de 300 µL pour la plaque de 96 puits. Le volume a été ensuite partagé sur les trois puits.

### 3.5.4 Étude de viabilité des cellules par AlamarBlue®

Le test d'AlamarBlue® permet d'étudier la viabilité des cellules. Le but de cette étude est de déterminer la toxicité du chitosane et de le comparer à celle du DharmaFECT®, un agent de transfection *in vitro* commercialisé. Pour ce fait, les cellules transfectées ont été incubées après 24 heures avec du milieu de culture contenant 10% d'AlamarBlue®. Tous les échantillons sont en quadruplicata. La Tecan Infinite® 200 a été utilisée pour lire la plaque des cellules 4 heures après l'ajout de l'AlamarBlue®. Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont 570 nm et 600 nm respectivement. La viabilité est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de viabilité des cellules} = \frac{(\epsilon_{\text{OX}})\lambda_2 A\lambda_1 - (\epsilon_{\text{OX}})\lambda_1 A\lambda_2}{(\epsilon_{\text{RED}})\lambda_1 A'\lambda_2 - (\epsilon_{\text{RED}})\lambda_2 A'\lambda_1} \times 100$$

$\lambda_1 = 570 \text{ nm}$

$\lambda_2 = 600 \text{ nm}$

$\epsilon_{\text{OX}}$  = coefficient d'absorption molaire de l'AlamarBlue® oxydé

$\epsilon_{\text{RED}}$  = coefficient d'absorption molaire de l'AlamarBlue® réduit

$A$  = L'absorbance des échantillons testés

$A'$  = L'absorbance du contrôle (non transfecté)

### 3.5.5 Étude par cytométrie en flux de l'internalisation des nanoparticules chitosane/siApoB

Les cellules HepG2 ont étéensemencées dans des plaques de 24 puits. Le lendemain, elles ont été transfectées par quatre formulations de chitosane (80-10-5, 80-40-5, 92-10-5, 92-40-5) complexées avec siApoB1 ou siApoB2 marqués avec 5' 6-FAM. La concentration finale des siARN par puits était égale à 100 nM. Le but de cette expérience est d'étudier l'effet des modifications chimiques des siARN complexés avec le chitosane sur l'internalisation. En effet, siApoB1 et siApoB2 sont les mêmes séquences et ne se diffèrent que par la présence ou non de modifications chimiques. Les contrôles positifs utilisés pour cette expérience sont DharmaFECT®/siApoB1 et DharmaFECT®/siApoB2. Le contrôle négatif est les cellules non transfectées. Les cellules non transfectées permettent de distinguer entre l'autofluorescence des cellules et la fluorescence des siApoB. Un jour après la transfection, les cellules ont été trypsinisées et resuspendues dans du milieu de culture. Le cytomètre en flux utilisé est BD Canto (BD, Franklin Lakes, NJ USA). L'excitation des cellules a été faite par un laser de 488 nm et la détection avec un filtre à bande passante de 530/30 nm. Pour chaque échantillon 20,000 événements ont été comptés.

### 3.5.6 Analyse par microscopie confocale

La microscopie confocale est une technique qualitative, contrairement à la cytométrie en flux. Elle permet d'observer le cheminement des nanoparticules chitosane/siARN au sein de la cellule afin de confirmer les résultats déjà obtenus par cytométrie en flux. Elle permet aussi d'observer l'échappement endosomal ainsi que la décomplexation et la libération des siARN au sein de la cellule. Les cellules HepG2 ont étéensemencées dans des petits « pétri à fond de verre » (*glass bottom petri*, P35G-1.5-14-C, MatTek, Ashland, MA, USA) de diamètre égal à 1,9 cm. Elles ont été transfectées après 24 heures avec les siGLO verts marqués par le fluorophore 6-FAM et complexés avec du chitosane marqué à la rhodamine B isothiocyanate (RITC) fluorescente (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada). Les siGLO sont des indicateurs qui permettent une évaluation visuelle de la transfection chez les cellules des mammifères (Dharmacon, 2014). Le CellMask™ (H32720, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a été dilué dans le milieu de culture des cellules. Les cellules HepG2 ont été incubées, 24 heures après la transfection, avec le CellMask™ pendant 5 minutes. Le but était de colorer les membranes cellulaires afin de les délimiter. Le microscope confocale utilisé est Zeiss LSM510 META

Axioplan 200 (Carl Zeiss Canada Ltd., Toronto, ON, Canada). L'excitation des siGLO, la rhodamine et du CellMask™ est à des longueurs d'ondes de 494, 540 et 346 nm et leur émission est à des longueurs d'ondes de 520, 625 et 442 nm respectivement. Dans les photos, le FAM est coloré en vert, le chitosane en rouge, la membrane cellulaire en bleu et les nanoparticules en jaune.

### **3.5.7 Extraction de l'ARN à partir des cellules HepG2**

Les cellules HepG2 ont étéensemencées dans des puits d'une plaque de 24. Un traitement avec la chitosanase *Streptomyces griseus* doit avoir lieu pour faciliter l'extraction. En effet, le chitosane collé sur la membrane des cellules peut se lier à l'ARN extrait (Alameh et al., 2010). Pour ce, 10 mU de chitosanase ont été ajouté par puits, 24 heures après la transfection. Les cellules ont été incubées avec la chitosanase pendant 60 minutes à 37 °C et à 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été ensuite lavées avec du PBS (*Phosphate buffered saline*). L'extraction a été faite à l'aide du kit RNA XS® selon les spécifications du fabricant. L'ARN a été conservé à -20 °C jusqu'à son utilisation ultérieure.

### **3.5.8 Vérification de la qualité et de la concentration de l'ARN extrait**

La qualité et la concentration de l'ARN ont été étudiées par électrophorèse capillaire microfluidique en utilisant un système Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada). La machine utilise des puces à ARN. La séparation électrophorétique de l'échantillon d'ARN est excitée par un laser. La fluorescence induite est détectée puis analysée par le logiciel 2100 Bioanalyzer expert. Ce logiciel génère une image d'électrophérogramme. Il étudie l'intégrité et la pureté de l'ARN en se basant sur le rapport 28S/18S de l'ARN ribosomique : le RIN (RNA Integrity Number). Le RIN varie de 1 à 10. L'échantillon le plus dégradé a un RIN égal à 1 et l'échantillon intact a un RIN égal à 10 (Agilent Technologies, 2004). La migration de l'échantillon dans les puces à ARN permet aussi de déterminer sa concentration. Chaque échantillon d'ARN a été dénaturé à 70 °C pendant 10 minutes. Un gel contenant un colorant des acides nucléiques a été rempli dans la puce «Nano 600 kit» (Agilent). Un volume de 1 µL de chaque échantillon a été chargé dans chaque puits de la puce. Chaque puce supporte 12 échantillons et l'échelle de poids moléculaire qui permet d'estimer la taille des bandes. Après avoir vortexé la puce à 2 400 rpm durant 1 minute, elle a été transférée dans l'appareil Bioanalyzer.

### 3.5.9 Réaction de transcription inverse (RT-PCR)

L'ARN messager (ARNm) est rétrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide du kit QuantiTect® Reverse Transcription (205311, QIAGEN, Toronto, ON, Canada). La première étape est de dénaturer l'ARN en l'incubant 10 minutes à 60 °C. Ensuite, le thermocycleur Rotor-GeneTM6000 (Corbett Life Science, NSW, Australie) est programmé pour effectuer un cycle qui débute par 15 minutes à 42 °C puis trois minutes à 95 °C. Les amorces utilisées sont un mélange optimisé d'oligo-dT et des amorces aléatoires fournies dans le kit.

## 3.6 Étude *in vivo*

Une étude *in vivo* a été faite dans notre laboratoire par Diogo Lopes De Jesus en utilisant les souris C57BL/6 (section 1.6.3). Une série de 3 injections de nanoparticules chitosane/siApoB1 à une semaine d'intervalle (1 mg/kg) ont été effectuées afin de silencer le gène ApoB. Les résultats ont démontré que le taux d'apolipoprotéine B a été réduit chez les souris traitées par rapport au groupe contrôle. Par contre cette diminution n'a pas été confirmée au niveau génomique (De Jesus, 2011). C'est pourquoi dans cette deuxième partie de l'étude *in vivo*, l'ARNm ApoB extrait du foie a été quantifié par qRT-PCR.

### 3.6.1 Séquençage du gène ApoB

Le séquençage du gène ApoB à partir des souris C57BL/6 permet de déterminer si ces souris expriment ce gène au niveau du foie et s'il existe des mutations géniques qui peuvent empêcher les silençages du gène par les siApoB.

#### 3.6.1.1 Extraction de l'ARN à partir du tissu du foie des souris C57BL/6

Les tissus des foies des souris C57BL/6 ont été homogénéisés à température ambiante et dans un broyeur Potter-Elvehjem en ajoutant 1 mL de TRIzol® pour chaque échantillon qui pèse entre 50 et 100 mg. Pour chaque millilitre de TRIzol®, un volume de 0,2 mL de chloroform a été ajouté. Les tubes ont été vortexés pendant 15 secondes et incubés à température ambiante pendant 3 minutes. Ils ont été centrifugés à une vitesse de 12,000 x g pendant 15 minutes à 2-8 °C. Le mélange dans les tubes a été séparé en 3 phases : phase de phenol-chlorophorm rouge, interphase et phase aqueuse qui est incolore et qui contient l'ARN. La phase aqueuse a été transférée dans un autre tube. L'ARN a été précipité en ajoutant l'alcool isopropylique (0,5 mL/1 mL de TRIzol®). Les échantillons ont été incubés pendant 10 minutes à 15-30 °C. Après une



centrifugation de 5 minutes à une vitesse de 7500 x g à une température de 2 à 8 °C, l'éthanol a été aspiré. L'ARN a été séché à température ambiante puis resuspendu dans l'eau sans ARNase et sans ADNase. L'ARN a été conservé à -20 °C jusqu'à son utilisation ultérieure.

### 3.6.1.2 Amplification des parties qui délimitent les siApoB par PCR

L'ARN extrait à partir des foies des souris C57BL/6 a été rétrotranscrit en ADNc (section 3.5.9). L'ADNc a été ensuite amplifié par PCR (section 3.5.2.1). Deux couples d'amorces ont été utilisés (Tableau 3.4). Le premier couple (**Amorce 3**) délimite la région qui contient la séquence complémentaire des siApoB1 et des siApoB2. Le deuxième couple (**Amorce 4**) délimite la région qui contient la séquence complémentaire des siApoB3.

**Tableau 3.4 Les séquences des couples d'amorces utilisés pour l'amplification des parties qui délimitent les siApoB par PCR**

	Sens	Antisens
<b>Amorce 3</b>	CCCAGATTTCAAGGGATTCA	AACATCACGTCTGATGCGAA
<b>Amorce 4</b>	TCCAACGATCATGGACTTCA	GAAGGAAAAGGGTTTGAGCC

### 3.6.1.3 Séquençage et analyses des produits de PCR

Les produits de PCR ont été purifiés du gel d'agarose en utilisant un le kit QIAquick Gel Extraction de Qiagen (section 3.5.2.2). Les produits des deux PCR ont été séquencés par la technique de Sanger au service de séquençage de l'institut de recherche en immunologie et en cancérologie (IRIC) en utilisant les deux couples d'amorces (**Amorce 3**) et (**Amorce 4**).

## 3.6.2 Étude de silençage du gène ApoB *in vivo* par les nanoparticules 92-10-5 siApoB1

L'ARNm total a été extrait du foie en utilisation le TRIzol® (section 3.6.1.1). La qualité et la concentration de l'ARN ont été vérifiées par électrophorèse capillaire microfluidique en utilisant un système Agilent 2100 Bioanalyzer (section 3.5.8). Ensuite, une RT-PCR a été effectuée à

partir des ARN totaux pour permettre la synthèse des ADNc qui ont été utilisés pour les analyses par qRT-PCR (section 3.5.9).

### 3.7 La réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (qPCR) *in vitro* et *in vivo*

L'efficacité de silençage de l'ARN messenger ApoB *in vivo* et *in vitro* est déterminée par la PCR en temps réel (qRT-PCR : *quantitative real-time polymerase chain reaction*) en utilisant la chimie TaqMan<sup>®</sup>. Cette technique permet de quantifier l'ADNc. Elle est spécifique et permet de quantifier le faible nombre de copies du gène cible. La sonde qPCR TaqMan<sup>®</sup> possède à ces deux extrémités 5' et 3' un Reporter et un Quencher respectivement. Le Quencher absorbe la fluorescence du Reporter. La sonde est dégradée par l'activité de la Taq polymérase au cours de l'amplification. Le Reporter est alors libéré. Sa fluorescence n'est plus absorbée par le quencher, mais plutôt détectée par la machine. La fluorescence augmente dépendamment du nombre de copies. La courbe de la fluorescence en fonction du nombre de cycles permet d'avoir le cycle seuil (Ct : *cycle threshold*). Par conséquent, le silençage des ARN messagers peut être déduit en comparant les cellules non transfectées ou les souris non traitées par rapport à celles transfectées ou traitées.

L'expression relative est déduite à partir des équations suivantes :

$$\Delta Ct_{\text{échantillon}} = Ct_{\text{ApoB}} - Ct_{\text{GAPDH}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{échantillon}} - \Delta Ct_{\text{calibrateur (cellules non transfectées ou souris non traitées)}}$$

$$\text{Expression relative} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

La chimie TaqMan<sup>®</sup> est spécifique et permet de quantifier même les gènes à faible nombre de copies. Pour réaliser cette expérience, chaque tube d'ADNc a été divisé en six puits : trois pour quantifier le gène cible (ApoB) et trois pour quantifier le gène de ménage (*Housekeeping gene*). Chaque puits contenait un volume de 2 à 3 µL d'ADNc avec une concentration finale égale à 50 ng par puits. De plus, deux solutions ont été préparées contenant chacune TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Master Mix 2X (10µ/puits), la sonde (1µ/puits) et l'eau (6 à 7 µL/puits). Chaque solution est spécifique soit pour le gène ApoB soit pour le GAPDH (La glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase). Un volume de 17 à 18 µL de ce mixte a été ajoutés à chaque puits. Le volume final par puits est égal à 20 µL. La plaque de 96 ou de 384 puits a été centrifugée avant d'être insérée dans la machine Applied Biosystems 7900HT en mode standard. La machine

a été programmée à chauffer la plaque pendant 10 minutes à 95°C pour activer la polymérase puis à assurer 40 cycles composés de 2 phases (une phase de dénaturation et une phase d'hybridation et d'élongation). La dénaturation a été effectuée à 95°C pendant 15 secondes. L'hybridation et l'élongation ont été assurées à 60 °C pendant une minute. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel ExpressionSuite. Les valeurs ont été exprimées en pourcentage d'expression du gène ApoB en accordant une expression de 100% pour les échantillons des cellules non transfectées (*in vitro*) et pour le groupe de souris qui n'a pas suivi une diète riche et n'a pas été traité (*in vivo*).

### **3.8 Tests statistiques**

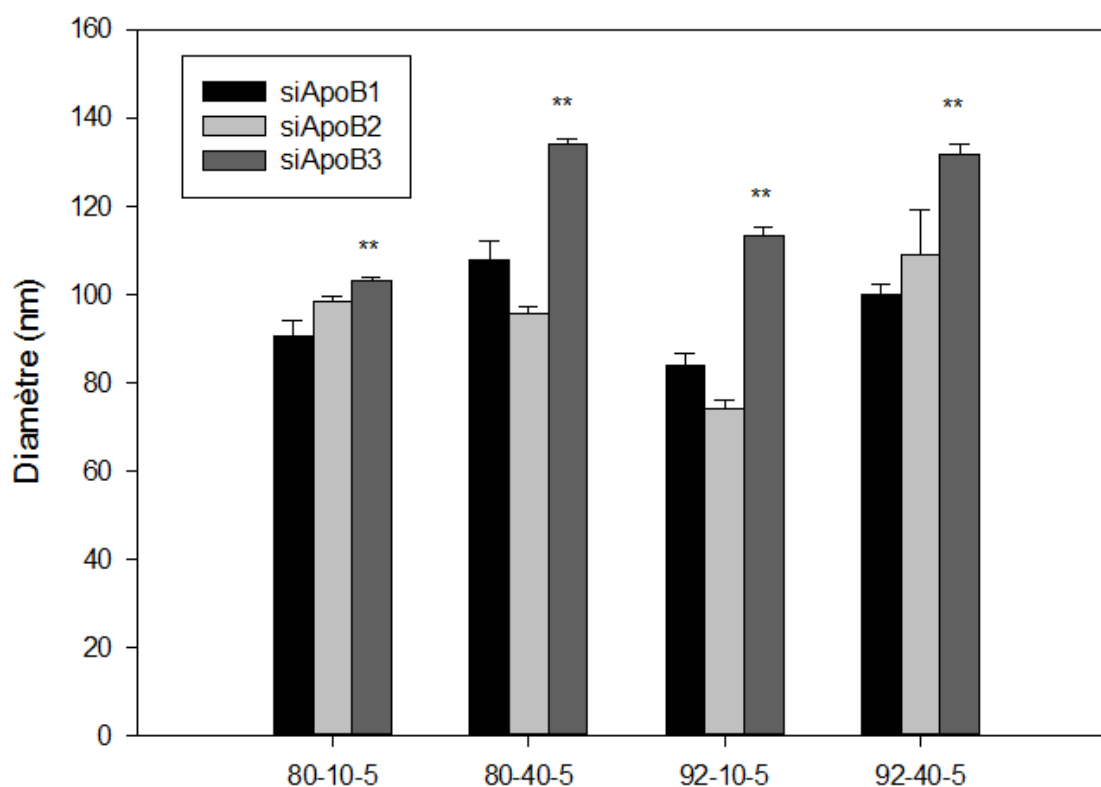
Plusieurs tests statistiques ont été utilisés. Par exemple, le test t a été utilisé pour permettre de comparer deux échantillons. Le test t apparié a permis de comparer les mêmes échantillons avant et après un temps d'incubation. Le test ANOVA à un facteur a été utilisé pour comparer plusieurs échantillons en même temps. Le test ANOVA à trois facteurs a été choisi pour comparer entre plusieurs échantillons en présence de plusieurs facteurs qui peuvent influencer les résultats. Dans notre cas, ce test a été utilisé pour comparer entre les nanoparticules qui contiennent des siARN différents, des formulations de chitosane différentes et qui ont été incubées pendant différents temps. Tous les tests choisis sont suivis par le test post-hoc Tukey. La différence est considérée statistiquement significative si la valeur P est inférieure à 0,05 (\*) et très significative si elle est inférieure à 0,01 (\*\*).

## CHAPITRE 4 RÉSULTATS

### 4.1 Caractérisation physicochimique des nanoparticules chitosane/siApoB

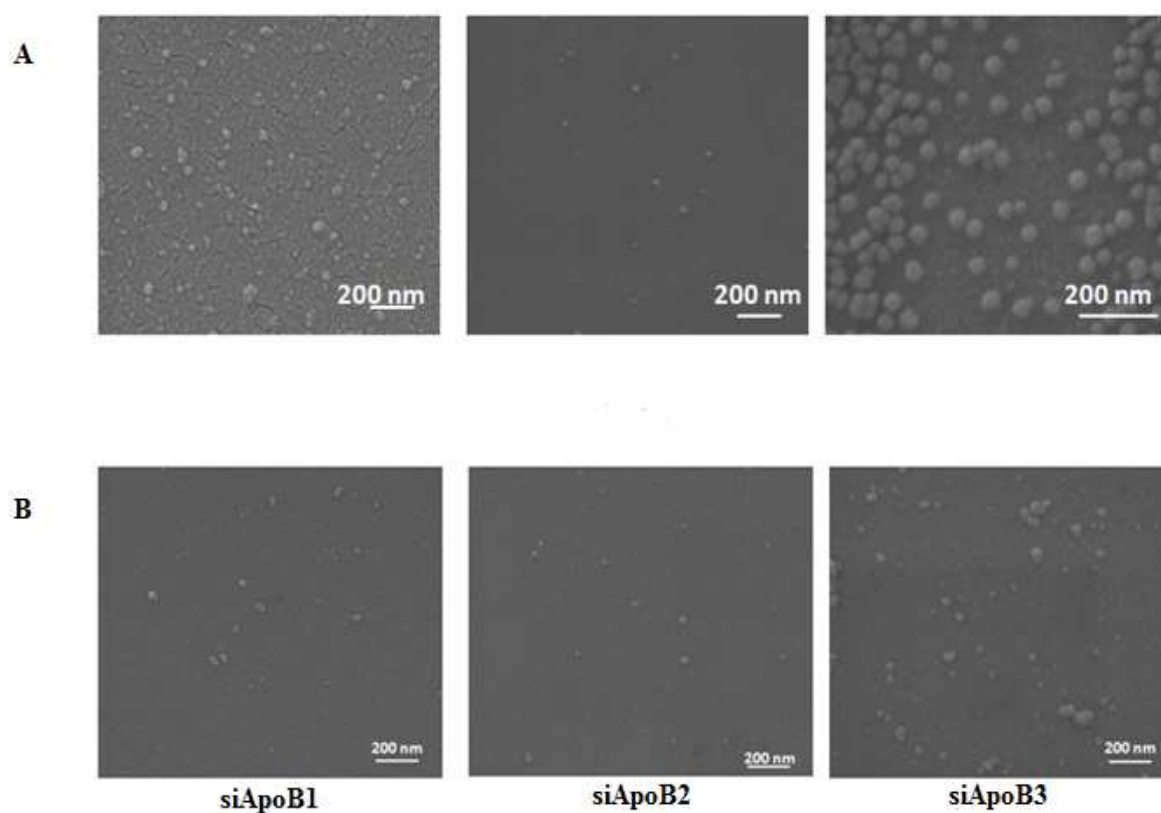
#### 4.1.1 Détermination de la taille des nanoparticules chitosane/siApoB

La détermination de la taille des nanoparticules chitosane/siApoB aide à prédire leurs interactions avec la cellule, leurs comportements au sein d'elle et au sein d'un organisme vivant ainsi que leurs interactions avec le système immunitaire. Le diamètre hydrodynamique des nanoparticules, mesuré par DLS, varie entre 71 et 135 nm, en considérant les écarts-types (**Figure 4-1**). Il existe une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre la taille des nanoparticules formées de chitosane à MM égale à 10 et la taille des nanoparticules formées de chitosane à MM égale à 40. Les nanoparticules contenant du chitosane avec une MM plus élevée ont des tailles supérieures. D'autre part, il n'existe pas de différence significative entre les nanoparticules contenant du chitosane avec des DDA différents. Les nanoparticules chitosane/siApoB3 sont de plus grande taille que les nanoparticules chitosane/siApoB1 et les nanoparticules chitosane/siApoB2 qui contiennent moins de modifications chimiques ( $P < 0,001$ ). Par contre, il n'existe pas de différence significative entre les tailles des nanoparticules chitosane/siApoB1 et les nanoparticules chitosane/siApoB2 ( $P = 0,578$ ). Les mesures qui ont été réalisées par microscopie électronique à balayage environnementale (ESEM) montrent que, de façon générale, les tailles des nanoparticules sont inférieures aux tailles obtenues par DLS. De plus, les observations par le microscope confirment que les nanoparticules chitosane/siApoB3 ont une plus grande taille par rapport aux deux autres. L'ESEM montre aussi que les nanoparticules chitosane/siARN sont sphériques et uniformes (**Figure 4-2**). L'uniformité des nanoparticules est confirmée par l'indice de polydispersité (PDI) (**Figure 4-3**). Le PDI donne une idée sur la distribution des tailles des nanoparticules. En effet, la valeur de PDI est égale au carré de la variation standard divisée par la moyenne des diamètres. Les nanoparticules de plus faible PDI sont plus uniformes. Le PDI des différentes nanoparticules chitosane/siARN varie entre 0,20 et 0,26. La mesure de PDI montre qu'il ne dépend ni des séquences des siARN ni de leurs modifications chimiques ( $P = 0,998$ ).



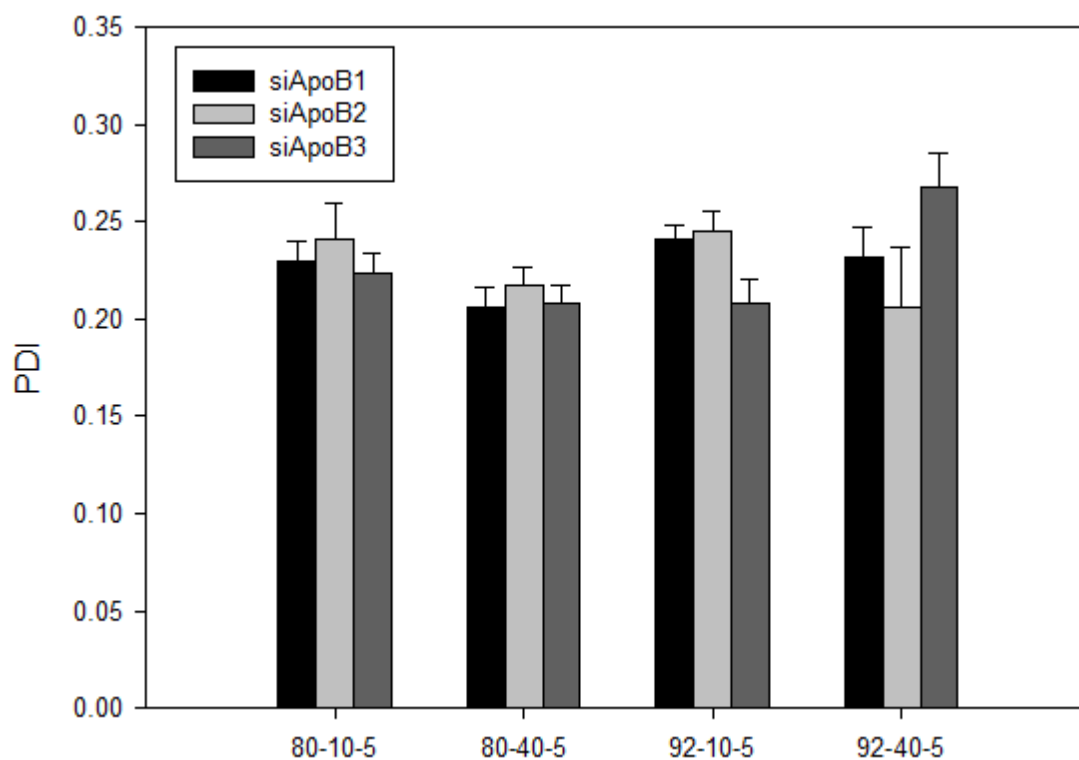
**Figure 4-1 : Taille des nanoparticules chitosane/siApoB mesurée par DLS pour les formulations de chitosane 80-10-5, 80-40-5, 92-10-5 et 92-40-5 complexées avec siApoB1, siApoB2 ou siApoB3**

Les nanoparticules ont été diluées dans une solution de NaCl (10 nM) avant d'effectuer les mesures. Les valeurs présentées sont la moyenne ( $\pm$  SD) de 15 séries de mesures de 3 échantillons (N=3,  $P^{**} < 0,001$ ). La différence entre la moyenne des tailles des nanoparticules contenant des siApoB3 et les moyennes des tailles des nanoparticules contenant des siApoB1 ou des siApoB2 est très significative.



**Figure 4-2 : Images des nanoparticules chitosane/siApoB obtenues par microscope électronique à balayage environnemental (ESEM)**

Les images des nanoparticules formées par siApoB1, siApoB2 ou siApoB3 complexées avec une des formulations de chitosane 92-10-5 (A) ou 92-40-5 (B) ont été prises à un grossissement de 160,000X avec l'ESEM en mode vide élevé (high vacuum mode).

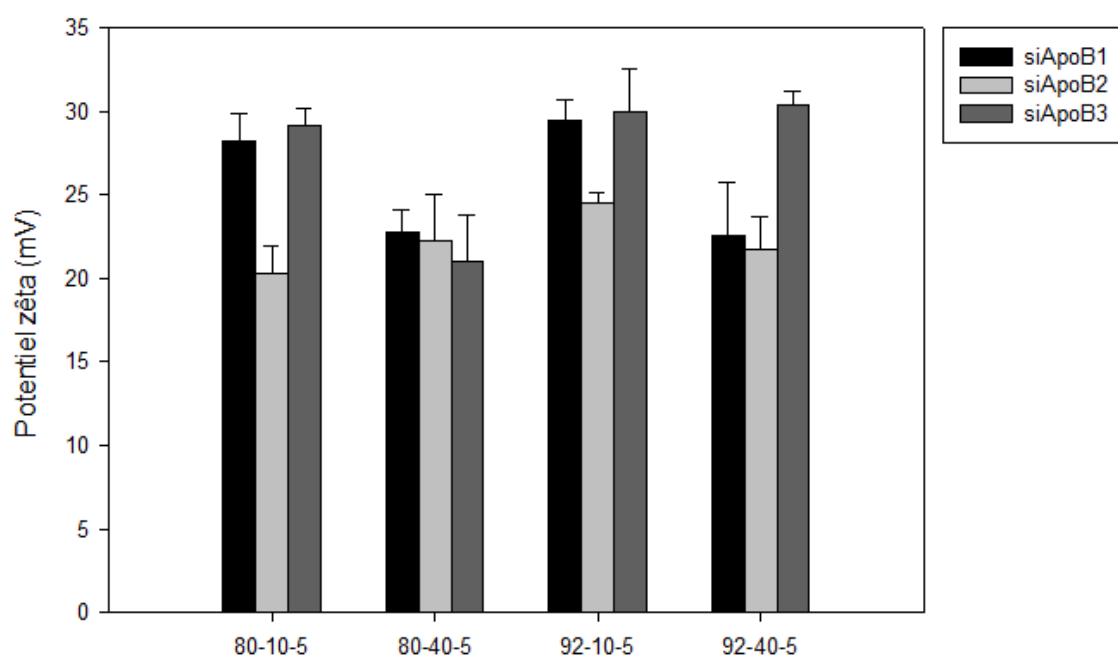


**Figure 4-3 : Indice de polydispersité (PDI) des nanoparticules chitosane/siApoB pour les formulations 80-10-5, 80-40-5, 92-10-5 et 92-40-5 mesuré par diffusion dynamique de la lumière (DLS)**

Les nanoparticules ont été diluées dans une solution de NaCl (10nM) avant d'effectuer la mesure. Les valeurs présentées sont la moyenne ( $\pm$  SD) de 15 séries de mesures de 3 échantillons (N=3, P=0,998). L'étude statistique montre qu'il n'existe pas de différence significative entre le PDI des nanoparticules chitosane/siApoB1, chitosane/siApoB2 et chitosane/siApoB3.

### 4.1.2 Détermination du potentiel $\zeta$ des nanoparticules chitosane/siARN

Le potentiel  $\zeta$  des nanoparticules donne une idée sur leur interaction avec les composants sanguins, la membrane cellulaire et le déroulement de l'échappement endosomal. En effet, un potentiel  $\zeta$  positif pourrait faciliter l'interaction des nanoparticules avec la membrane cellulaire polyanionique. Les mesures du potentiel  $\zeta$  des nanoparticules chitosane/siApoB démontrent qu'il varie entre +19 et +31 mV (**Figure 4-4**). De plus, Il n'existe pas une différence significative entre les valeurs du potentiel  $\zeta$  des nanoparticules composées de siApoB1, siApoB2 ou siApoB3 ( $P=0,131$ ).



**Figure 4-4 : Potentiel  $\zeta$  des nanoparticules chitosane/siApoB**

Les formulations de chitosane 80-10-5, 80-40-5, 92-10-5 et 92-40-5 sont complexées avec les siApoB1, siApoB2 ou siApoB3. Les valeurs présentées sont la moyenne des potentiels  $\zeta$  des nanoparticules ( $\pm$  SD) de 15 séries de mesures de 3 échantillons ( $N=3$ ). Les nanoparticules ont été diluées dans une solution de NaCl (10nM) avant d'effectuer la mesure. Il n'existe pas de différence significative entre les nanoparticules composées de différents siARN ( $P=0,131$ ).



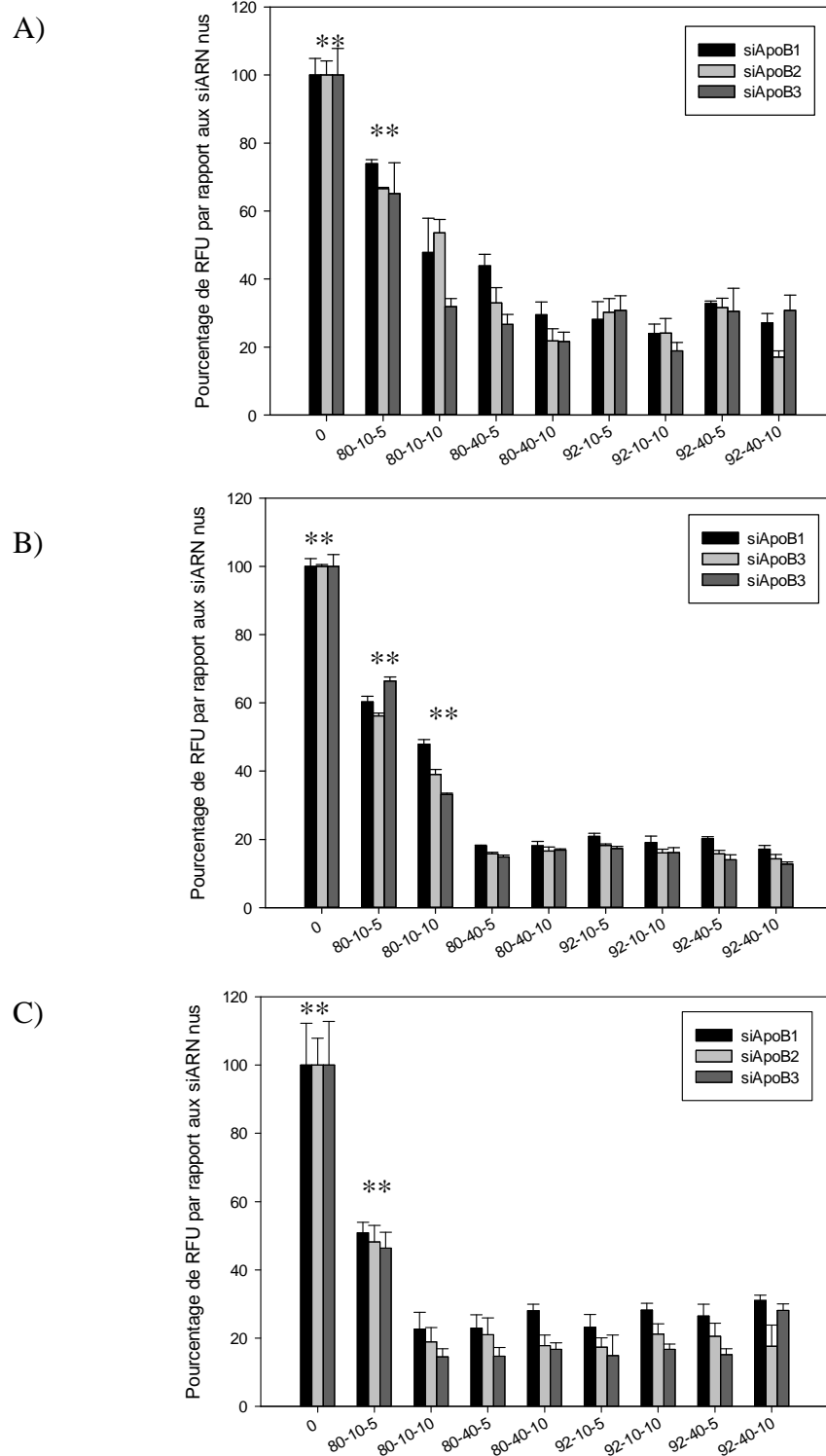
### 4.1.3 Les caractéristiques physicochimiques des nanoparticules chitosane/siApoB

**Tableau 4.1 : Taille, potentiel  $\zeta$  et PDI des nanoparticules chitosane/siApoB**

Chitosane	siARN	Taille (nm)	PDI	Potentiel $\zeta$ (mv)
80-10-5	siApoB1	$90,54 \pm 3,4$	$0,23 \pm 0,01$	$28,2 \pm 1,69$
	siApoB2	$98,25 \pm 1,09$	$0,24 \pm 0,01$	$20,3 \pm 1,6$
	siApoB3	$103,07 \pm 0,87$	$0,22 \pm 0,01$	$29,15 \pm 1,07$
80-40-5	siApoB1	$107,6 \pm 4,48$	$0,20 \pm 0,007$	$22,76 \pm 1,39$
	siApoB2	$95,76 \pm 1,36$	$0,22 \pm 0,008$	$22,25 \pm 2,83$
	siApoB3	$133,85 \pm 1,33$	$0,20 \pm 0,009$	$21 \pm 2,76$
92-10-5	siApoB1	$83,80 \pm 2,86$	$0,24 \pm 0,01$	$29,43 \pm 1,24$
	siApoB2	$73,87 \pm 2,26$	$0,24 \pm 0,01$	$24,5 \pm 0,67$
	siApoB3	$113,10 \pm 1,98$	$0,21 \pm 0,01$	$29,95 \pm 2,55$
92-40-5	siApoB1	$100,04 \pm 2,22$	$0,23 \pm 0,01$	$22,57 \pm 3,13$
	siApoB2	$108,8 \pm 10,42$	$0,20 \pm 0,03$	$21,7 \pm 1,97$
	siApoB3	$131,48 \pm 2,40$	$0,26 \pm 0,018$	$30,4 \pm 0,848$

#### 4.1.4 Étude de stabilité des nanoparticules chitosane/siApoB

La stabilité des nanocomplexes chitosane/siApoB a été étudiée pendant différents temps d'incubation (0,5, 4 et 20 heures) à pH 6,5, qui est égal au pKa du chitosane (**Figure 4-5**). Selon les études statistiques des résultats, les nanoparticules formées par les siApoB1 sont moins stables que les autres. Par contre, il n'existe pas de différence significative entre la stabilité des siApoB2 et siApoB3. La stabilité de toutes les nanoparticules devient plus importante après une incubation qui dure 4 heures à pH 6,5 par rapport à une incubation pendant 30 minutes. La stabilité ne dépend du ratio N : P qu'à 30 minutes d'incubation. Les nanoparticules formées par des chitosanes de ratio N : P égal à 10 sont plus stables que les ratios N : P égal à 5. D'autre part, la stabilité ne dépend pas de la masse moléculaire et du degré de désacétylation. Les nanoparticules contenant des chitosanes qui ont un degré de désacétylation égal à 80 et une masse moléculaire égale à 10 sont moins stables que les autres formulations après une incubation de 30 minutes et de 4 heures à pH 6,5 ( $P < 0,001$ ). Leur stabilité augmente après 20 heures d'incubation. Le chitosane 92-10-5 a déjà été utilisé dans notre groupe pour livrer les ADN plasmidiques (ADNp) *in vitro* (Jean, Alameh, De Jesus, et al., 2011; Lavertu et al., 2006) et *in vivo* et pour livrer les siARN (Alameh et al., 2012). Cette étude de stabilité montre qu'il forme des nanoparticules stables avec les trois siApoB. Le pourcentage de stabilité est égal à la différence entre le pourcentage des unités de fluorescence relative (RFU : *relative fluorescence units*) des siARN nus (100%) et le pourcentage de RFU des nanoparticules. À 30 minutes, le pourcentage de stabilité des nanoparticules 92-10-5/siApoB est  $70,3\% \pm 1,3$ . À 4 heures et à 20 heures, il est égal à  $81,2\% \pm 1,8$  et  $81,5\% \pm 4,2$  respectivement. Ces résultats corréleront avec les autres résultats de notre groupe qui montrent que le 92-10-5 peut former des nanoparticules stables.



**Figure 4-5: Étude de la stabilité des nanoparticules chitosane/siApoB à pH=6,5**

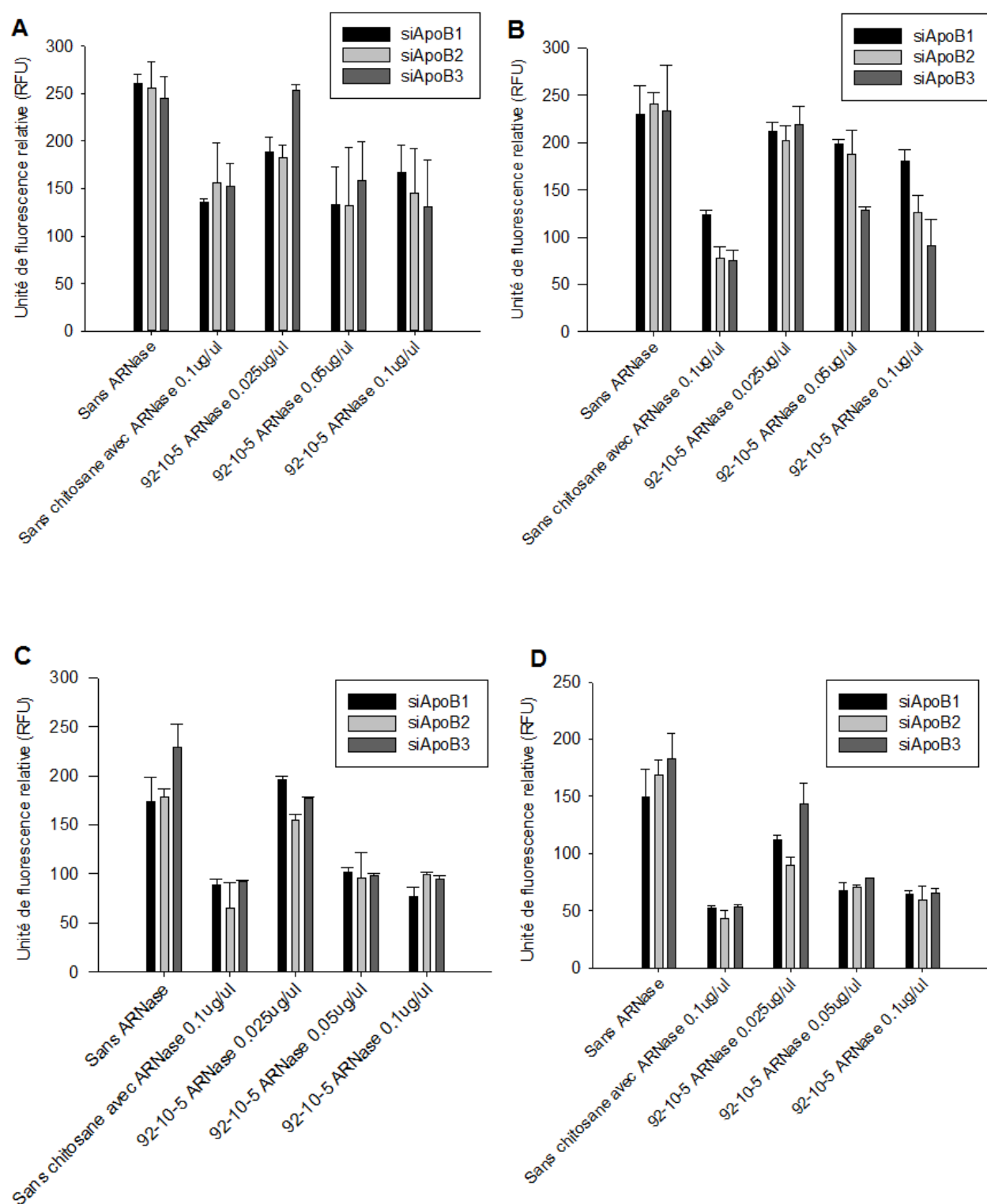
Les nanoparticules ont été incubées dans le PBS pendant : (A) :0,5heure, (B) :4 heures et (C) :20heures. La figure représente les moyennes ( $\pm$  SD) des pourcentages des unités de fluorescence relative (RFU) des siARN marqués par RiboGreen<sup>®</sup>. Les pourcentages des RFU des différents groupes (siARN nus et nanoparticules à base de différentes formulations de chitosane) ont été comparés (N=3,  $P^{**}<0,001$ )

#### **4.1.5 Étude de la protection des siARN par le chitosane contre la digestion des ARNase**

La protection des siApoB contre la digestion des ARNase à des concentrations physiologiques a été évaluée à l'aide d'un test utilisant le RiboGreen<sup>®</sup> pour marquer les siARN (**Figure 4-6**). Les résultats de ce test ont montré que la dégradation des siARN est directement dépendante de la concentration de l'ARNase et du temps d'incubation. En effet, la dégradation des siARN est plus importante quand la concentration de l'ARNase et le temps d'incubation augmentent. De plus, cette étude a montré qu'il n'existe pas de différence significative de dégradation des siARN en présence d'ARNase entre les siARN modifiés (siApoB2 et siApoB3) et les siARN non modifiés (siApoB1) ( $P>0,05$ ).

La complexation des siARN avec le chitosane 92-10-5 ne les a pas protégés contre la dégradation des ARNase. Assurément, il n'existe pas une différence significative de dégradation entre les siARN protégés et non protégés par le chitosane ( $P = 0,341$ ).

D'autre part, les siARN seuls qui ont été incubés à 37 °C en absence des ARNase se dégradent au cours du temps. Par exemple, les unités de fluorescence relative (RFU) des siApoB1 diminuent de 260 à 149 (111 unités de fluorescence relative) de 30 minutes à 24 h.



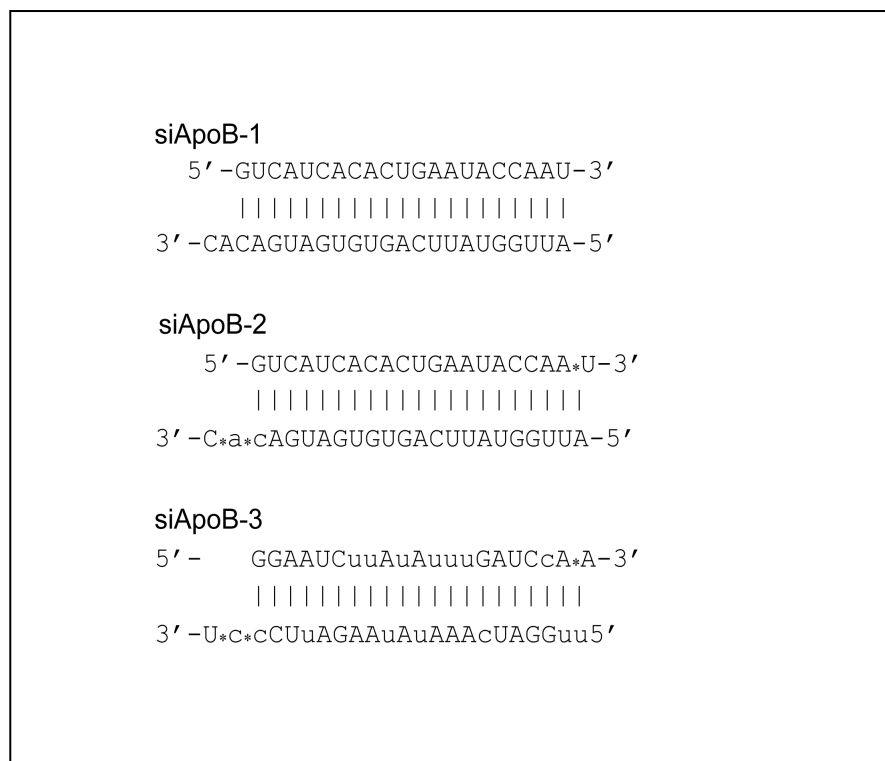
**Figure 4-6: Étude de protection des siARN contre la digestion, après une incubation de 30 minutes (A), 1 heure (B), 4 heures (C) ou 24 heures (D), des ARNase**

La figure représente les moyennes ( $\pm$  SD) des pourcentages des unités de fluorescence relative (RFU) des siARN marqués par RiboGreen<sup>®</sup>. Les RFU des différents groupes ont été comparés (N=3). L'étude statistique a montré qu'il n'existe pas de différence significative entre la dégradation des siApoB1, des siApoB2 et des siApoB3 ( $P = 0,216$ ). De même, il n'existe pas de différence de dégradation entre les siARN seuls et les siARN complexés avec le chitosane ( $0,341$ ).

## 4.2 Étude *in vitro*

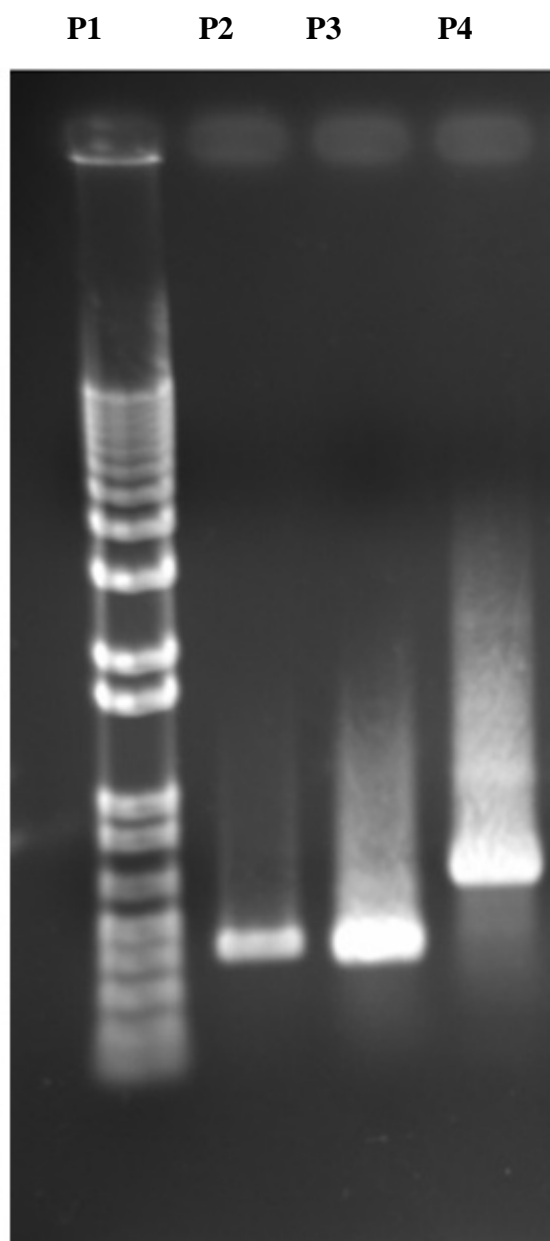
### 4.2.1 Séquençage partiel du gène ApoB montrant les séquences cibles des siApoB

L'intégrité des séquences cibles spécifiques à nos siARN a été confirmée par séquençage. Les ARNm ApoB des cellules HepG2 ont été extrait et rétrotranscrit en ADNc. La **figure 4-8** montre la migration sur gel d'agarose des séquences amplifiées de l'ADNc-ApoB qui délimitent les parties cibles des siApoB. Les résultats montrent que les séquences des siApoB1, siApoB2 et siApoB3 sont similaires à leurs parties cibles dans l'ARNm ApoB extrait à partir des cellules HepG2 (**Figure 4-9**). Ceci confirme l'intégrité des séquences codantes pour l'apolipoprotéine B dans nos cellules HepG2. La **figure 4-10** est la séquence en acides aminés obtenue en traduisant le résultat du séquençage.



**Figure 4-7: Séquences des trois duplex siApoB utilisés dans ce projet (siApoB1, ApoB2 et ApoB3)**

Les nucléotides modifiés par 2'O-Méthyle sont en minuscules et les liaisons phosphorothioates sont représentées par les astérisques. La séquence du siApoB1 a été rapportée par Zimmermann *et al.* et Watanabe *et al.* (Watanabe *et al.*, 2009; Zimmermann *et al.*, 2006). La séquence du siApoB2 a été rapportée par Soutschek *et al.* 2004 (Soutschek *et al.*, 2004), alors que la séquence du siApoB3 a été rapportée par Zimmermann *et al.* 2006 (Zimmermann *et al.*, 2006). À noter que les siARN utilisés ciblent à la fois les ARNm de l'ApoB humain et murin.

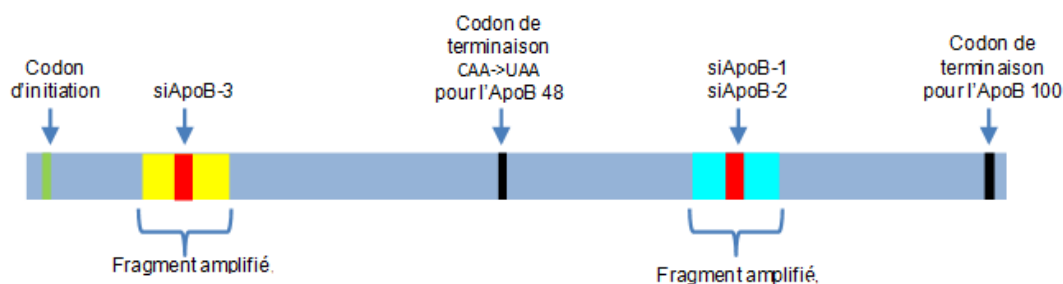


**Figure 4-8: Migration des séquences rétrotranscrites à partir de l'ARNm ApoB extrait des cellules HepG2 qui délimitent la cible des siApoB.**

P1 : échelle de poids moléculaires, P2 : la région qui délimite siApoB3, P3 : la région qui délimite siApoB1 et siApoB2 et P4: un contrôle positif de la PCR.



A)



B)

```

1 attcccaccg ggacctgcgg ggctgagtgc ctttctcggt tgctgcccgt gaggagcccc
61 cccagccagc cagggccgcg aggccgaggg cagggccgcag cccaggagcc gccccaccgc
121 agctggcgat gaccgcgcg aggccgcgcg tgctggcgct gctggcgctg cctgcgctgc
181 tgctgctgct gctggcgggc gccagggccg aagaggaaat gctggaaaat gtcagcctgg
241 tctgtccaaa agatgcgacc cgattcaagc acctccggaa gtacacatac aactatgagg
301 ctgagagttc cagtggagtc cctgggactg ctgattcaag aagtgccacc aggatcaact
361 gcaaggttga gctggaggtt cccagctctt gcagcttcat cctgaagacc agccagtgcg
421 ccttgaaaga ggtgtatggc ttcaaccctg agggcaaagc cttgctgaag aaaaccaaga
481 actctgagga gtttctgca gccatgtcca ggtatgagct caagctggcc attccagaag
541 ggaagcaggt tttcctttac cggagaaaag atgaacctac ttacatcctg aacatcaaga
601 ggggcatcat ttctgccctc ctggttcccc cagagacaga agaagccaag caagtgttgt
661 ttctggatac cgtgtatgga aactgctcca ctacttttac cgtcaagacg aggaagggca
721 atgtggcaac agaaatatcc actgaaagag acctggggca gtgtgatcgc ttcaagccca
781 tccgcacagg catcagccca cttgctctca tcaaaggcat gacccgcccc ttgtcaactc
841 tgatcagcag cagccagtcg tgtcagtaca cactggacgc taagaggaag catgtggcag
901 aagccatctg caaggagcaa cacctcttcc tgcttttctc ctacaagaat aagtatggga
961 tggtagcaca agtgacacag actttgaaac ttgaagacac accaaagatc aacagccgct
1021 tctttggtga aggtactaag aagatggggc tcgcatttga gagcacaaa tccacatcac
1081 ctccaaagca ggccgaagct gttttgaaga ctctccagga actgaaaaaa ctaaccatct
1141 ctgagcaaaa tatccagaga gctaattctt tcaataagct gggtactgag ctgagaggcc
1201 tcagtgatga agcagtcaca tctctcttgc cacagctgat tgaggtgtcc agccccatca
1261 ctttacaagc cttggttcag tgtggacagc ctgagtgtct cactcacatc ctccagtggc
1321 tgaaacgtgt gcatgccaac ccccttctga tagatgtggg cacctacctg gtggccctga
1381 tccccgagcc ctgagcacag cagctgcgag agatcttcaa catggcgagg gatcagcgca
1441 gccgagccac cttgtatgct ctgagccacg cggcacaaca ctatcataag acaaacccta
1501 cagggaccca ggagctgctg gacattgtca attacctgat ggaacagatt caagatgact
1561 gcactgggga tgaagattac acctatttga ttctgcgggt cattggaaat atgggcaaaa
1621 ccatgggaca gttaactcca gaactcaagt cttcaatcct gaaatgtgtc gaaagtacaa
1681 agccatcact gatgatccag aaagctgcca tccaggctct gcggaaaatg gagcctaag
1741 acaaggacca ggaggttctt cttcagactt tccttgatga tgcttctccg ggagataagc
1801 gactggctgc ctatcttatg ttgatgagga gtccttcaca ggcagatatt aacaaaattg
1861 tccaaattct accatgggaa cagaatgagc aagtgaagaa ctttgtggct tcccatattg
1921 ccaatatctt gaactcagaa gaattggata tccaagatct gaaaaagtta gtgaaagaag
1981 ctctgaaaga atctcaactt ccaactgtca tggacttcag aaaattctct cggaactatc
2041 aactctacaa atctgtttct cttccatcac ttgaccacgc ctgagccaaa atagaaggga
2101 atcttatatt tgatccaaat aactaccttc ctaaaagaaag catgctgaaa actaccctca
2161 ctgcctttgg atttgcttca gctgacctca tcgagattgg cttggaagga aaaggctttg
2221 agccaacatt ggaagctctt tttgggaagc aaggattttt cccagacagt gtcaacaaag
2281 ctttgtactg ggttaatggt caagttcctg atggtgtctc taaggtctta gtggaccact
//
6481 tcccacagca agctaagat tatctgaatt cattcaattg ggagagacaa gtttcacatg
6541 ccaaggagaa actgactgct ctcaaaaaa agtatagaat tacagaaaat gatatacaaa
6601 ttgcattaga tgatgcaaaa atcaacttta atgaaaaact atctcaactg cagacatata
6661 tgatcaaat tgatcagtat attaaagata gttatgattt acatgatttg aaaatagcta
6721 ttgctaatat tattgatgaa atcattgaaa aattaaagag tcttgatgag cactatcata
//

```

```

9901 ttgaagtgtc tccattcacc atagagatgt cggcattcgg ctatgtgttc ccaaaagcag
9961 tcagcatgcc tagtttctcc atcctagggt ctgacgtccg tgtgccttca tacacattaa
10021 tcctgc catc attagagctg ccagtccttc atgtccctag aaatctcaag ctttctcttc
10081 cagatttcaa ggaattgtgt accataagcc atatttttat tcttgccatg ggcaatatta
10141 cctatgattt ctcctttaaa tcaagtgtca tcacactgaa taccaatgct gaacttttta
10201 accagtcaga tattgttgct catctccttt cttcactctt atctgtcatt gatgcactgc
10261 agtacaaatt agagggcacc acaagattga caagaaaaag gggattgaag ttagccacag
10321 ctctgtctct gagcaacaaa tttgtggagg gtagtcataa cagtactgtg agcttaacca
10381 cgaaaaatat ggaagtgtca gtggcaacaa ccacaaaagc ccaaattcca attttgagaa
10441 tgaatttcaa gcaagaactt aatggaaata ccaagtcaaa acctactgtc tcttcctcca
//
13681 aaagattgat tgacctgtcc attcaaaact accacacatt tctgatatac atcacggagt
13741 tactgaaaaa gctgcaatca accacagtca tgaaccctta catgaagctt gctccaggag
13801 aacttactat catctc ttaa ttttttaaaa gaaatcttca tttattcttc ttttccaatt
13861 gaactttcac atagcacaga aaaaattcaa actgcctata ttgataaaac catacagtga
13921 gccagccttg cagtaggcag tagactataa gcagaagcac atatgaactg gacctgcacc
13981 aaagctggca ccagggctcg gaaggtctct gaactcagaa ggatggcatt ttttgcaagt
14041 taaagaaaat caggatctga gttatatttc taaacttggg ggaggaggaa caaataaatg
14101 gagtctttat tgtgtatcat a

```

**Figure 4-9: Séquence nucléotidique de l'ARNm du gène ApoB humain. Référence NCBI de la séquence : NM\_000384.2**

(A) Le schéma et (B) la séquence détaillée de l'ARNm de l'ApoB humain. Les codons dans les encadrés correspondent, dans l'ordre, au site d'initiation (codon d'initiation) et au site de terminaison (codon-stop) de l'ApoB-48 et de l'ApoB-100. Les zones en jaune et cyan correspondent aux séquences amplifiées par PCR puis séquencées pour confirmer la présence du gène ApoB dans les cellules humaines (HepG2). Les zones en rouges correspondent, dans l'ordre, à la séquence ciblée par le siApoB3 puis celle ciblée par les siApoB1 et siApoB2. À noter que les siARN utilisés ciblent à la fois les ARNm de l'ApoB humain et murin.



#### 4.2.2 Toxicité et viabilité des cellules transfectées par les nanoparticules chitosane/siApoB par le test d'AlamarBlue®

La toxicité des nanoparticules chitosane/siApoB a été évaluée par le test d'AlamarBlue®. Elle est définie par l'équation suivante :

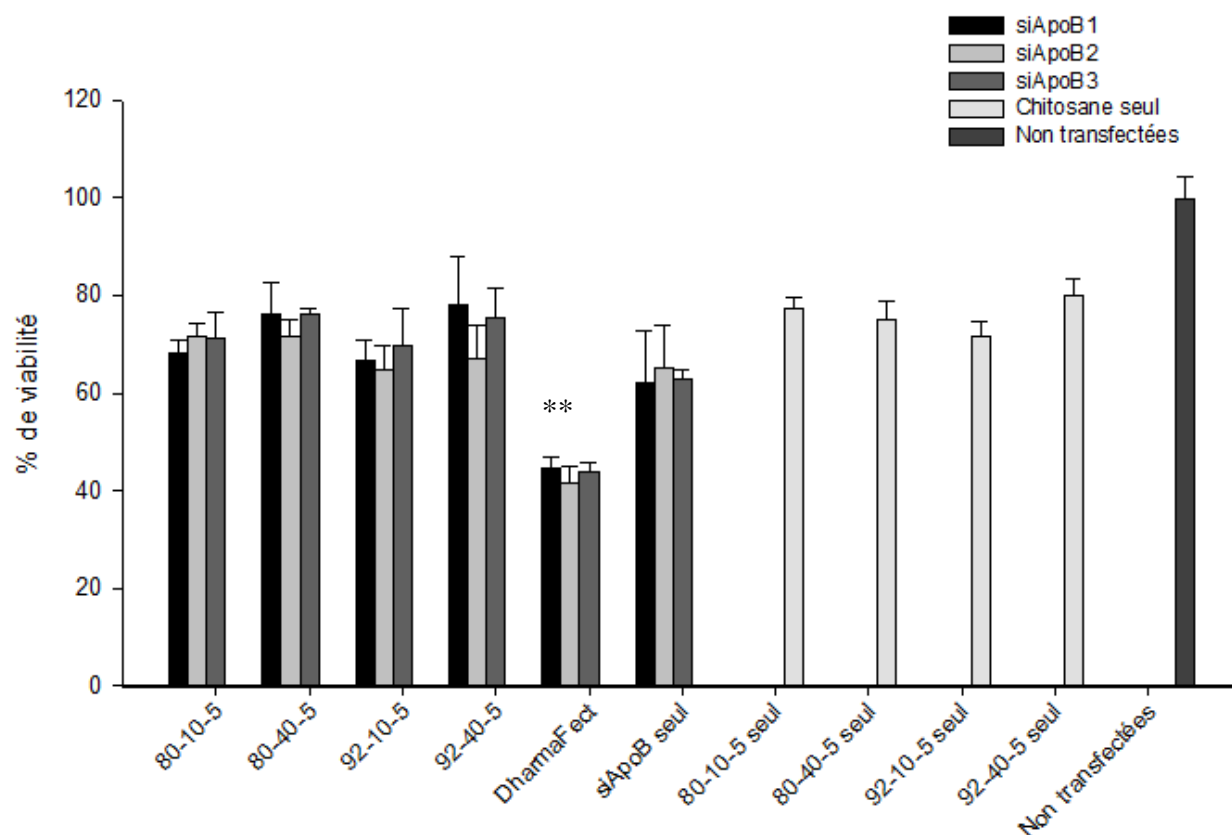
$$\% \text{ de toxicité} = 100 - \% \text{ de viabilité}$$

Les cellules transfectées et incubées avec du milieu de culture contenant l'AlamarBlue® ont été analysées par spectrophotomètre afin de déterminer le pourcentage de leur viabilité (**Figure 4-11**).

Les résultats montrent que la moyenne du pourcentage de viabilité des cellules transfectées par chitosane/siApoB1, chitosane/siApoB2 et par chitosane/siApoB3 varie entre 66-77%, 64-71% et 69-76% respectivement. De même, les cellules transfectées par les siApoB1, siApoB2 ou siApoB3 seuls ont une viabilité qui varie entre 62 et 65%. Selon l'étude statistique, la modification chimique des siARN n'a aucune influence sur la viabilité cellulaire ( $P=0,796$ ). La moyenne de viabilité des cellules traitées par les nanoparticules chitosane/siApoB est égale à  $71,42 \pm 4,2\%$  alors que celle des cellules traitées par les siARN nus est égale à  $63,34 \pm 1,6\%$ . Donc, la toxicité des nanoparticules utilisées ne serait pas due à l'utilisation du chitosane. En revanche, le chitosane semble même améliorer la viabilité des cellules traitées.

Toutes les formulations de chitosane complexées avec un des trois siApoB ne causent pas une toxicité qui dépasse 36%. La moyenne de la viabilité des cellules transfectées par les formulations de chitosane 80-10-5, 80-40-5, 92-10-5 et 92-40-5 est égale à  $70 \pm 1,9\%$ ,  $74 \pm 2,6\%$ ,  $67 \pm 2,5\%$  et  $73 \pm 2,6\%$  respectivement. En effet, la faible toxicité du chitosane ne dépend pas de la formulation utilisée.

D'autre part, la moyenne de viabilité des cellules transfectées par DharmaFECT®/siApoB est égale à  $43,31 \pm 1,64 \%$ . Alors que la moyenne de viabilité des cellules transfectées par chitosane/siApoB est égale à  $71,42 \pm 4,2$ . Donc, le DharmaFECT® est plus toxique que toutes les formulations utilisées du chitosane ( $P<0,001$ ).



**Figure 4-11: La viabilité des cellules HepG2 transfectées par des nanoparticules chitosane/siApoB, des siApoB seuls, du chitosane seul ou par DharmaFECT/siApoB**

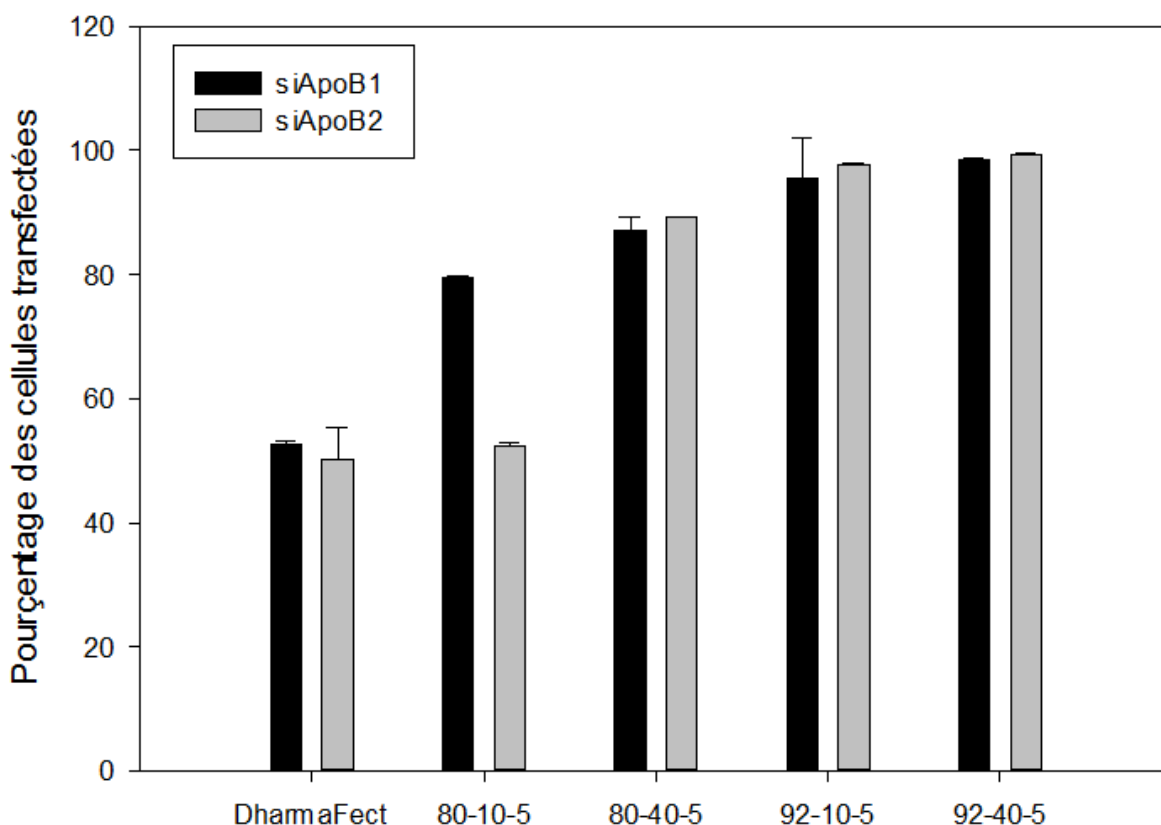
Les cellules ont été transfectées avec une concentration de siARN égale à 100nM par puits. Le test de viabilité a été réalisé 24 heures après la transfection en incubant les cellules durant 4 heures à 37 °C avec le milieu de culture contenant 10% de FBS et 10% d'AlamarBlue®. La fluorescence a été mesurée par spectrométrie en utilisant des longueurs d'ondes d'excitation/émission de 570 nm/600 nm. Les niveaux de viabilité des cellules transfectées avec les nanocomplexes composés de différentes formulations de chitosane et de différents siApoB ont été comparés à ceux des cellules traitées avec les différents siApoB nus, les cellules transfectées avec les nanocomplexes DharmaFECT®/siApoB, les cellules traitées par les différentes formulations de chitosane seul et des cellules non transfectées.

Les valeurs présentées sont la moyenne  $\pm$  SD, l'expérience a été effectuée en quadruplicate (N=4), (\*\* P<0,001).

### 4.2.3 Étude, par cytométrie en flux, de l'internalisation par les cellules HepG2 des nanoparticules chitosane/siARN spécifiques aux ARNm ApoB

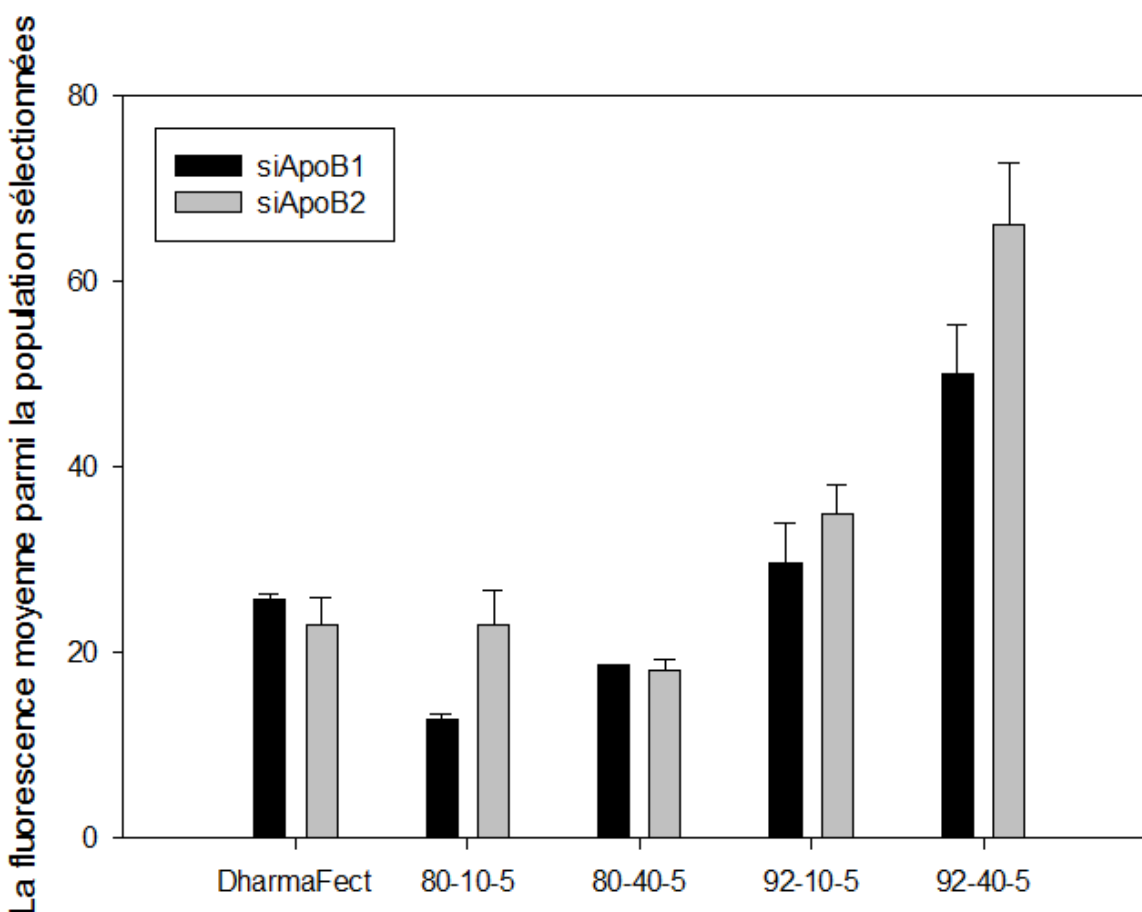
L'étude par cytométrie en flux a été réalisée afin d'étudier l'efficacité des nanoparticules, de différentes formulations de chitosane, à transfecter les cellules HepG2 comparativement aux nanoparticules formées par DharmaFECT®. De plus, elle permet d'étudier l'effet de la modification chimique sur la transfection puisque siApoB2 est la même séquence que siApoB1, mais modifiée chimiquement avec 2'-O-méthylation et par des liaisons phosphotioates.

Les résultats montrent que la formulation 80-10-5 est celle qui a un pourcentage d'internalisation le plus faible par rapport aux autres formulations de chitosane (**Figure 4-12**). Le pourcentage d'internalisation des siApoB1 livrés par le chitosane 80-10-5 est égal à 79% et celui des siApoB2 livré par la même formulation est égal à 52%. Alors que les pourcentages d'internalisation des siApoB1 et siApoB2 livrés par le chitosane 92-40-5 sont égaux à 98 et 99% respectivement. La formulation 92-40-5 est la formulation la plus efficace de point de vue du pourcentage d'internalisation et de point de vue de la fluorescence moyenne parmi la population sélectionnée des cellules transfectées ( $P < 0,05$ ) (**Figure 4-12, Figure 4-13**). Elle est même plus efficace que le contrôle commercialisé DharmaFECT®. De façon générale, les chitosanes qui ont un degré de désacétylation plus élevé sont plus efficaces. Les chitosanes qui ont un DDA élevé sont plus efficaces à transfecter les cellules par rapport au chitosane à faible DDA (Huang, Fong, Khor, & Lim, 2005; Liu, X. et al., 2007; Strand, Danielsen, Christensen, & Vårum, 2005). Les tests statistiques montrent qu'il n'existe pas de différence significative au niveau de l'efficacité des siApoB modifiés et les siApoB non modifiés ( $P = 0,97$ ).



**Figure 4-12: Pourcentage des cellules transfectées par siApoB 1ou siApoB2 marqués et livrés par le chitosane ou par DharmaFECT®**

Les cellules HepG2 ont été transfectées par des nanoparticules de chitosane/siApoB1 ou chitosane/siApoB2. Les siApoB utilisés sont marqués par le fluorophore 6-FAM. Après 24 heures de la transfection, les cellules ont été analysées par le cytomètre en flux. Le contrôle positif choisi est DharmaFECT® complexé avec les siApoB1 ou complexé avec les siApoB2. Le contrôle négatif est les cellules non transfectées qui permettent de déterminer l'autofluorescence cellulaire. Pour chaque échantillon, le nombre d'évènements qui ont été comptés est 20 000. L'excitation des cellules a été faite par un laser de 488 nm et la détection avec un filtre à bande passante de 530/30 nm. (N=2)



**Figure 4-13: La fluorescence moyenne parmi la population sélectionnée des cellules transfectées déterminée par cytométrie en flux**

Les cellules HepG2 ont été transfectées par des nanoparticules de chitosane/siApoB1 ou de chitosane/siApoB2. Les siApoB utilisés sont marqués par le fluorophore 6-FAM. Après 24 heures de la transfection, les cellules ont été analysées par le cytomètre en flux. Le contrôle positif choisi est DharmaFECT<sup>®</sup> complexé avec les siApoB1 ou complexé avec les siApoB2. Le contrôle négatif est les cellules non transfectées qui permettent de déterminer l'autofluorescence cellulaire. Pour chaque échantillon, le nombre d'évènements qui ont été comptés est 20 000. L'excitation des cellules a été faite par un laser de 488 nm et la détection avec un filtre à bande passante de 530/30 nm. (N=2)

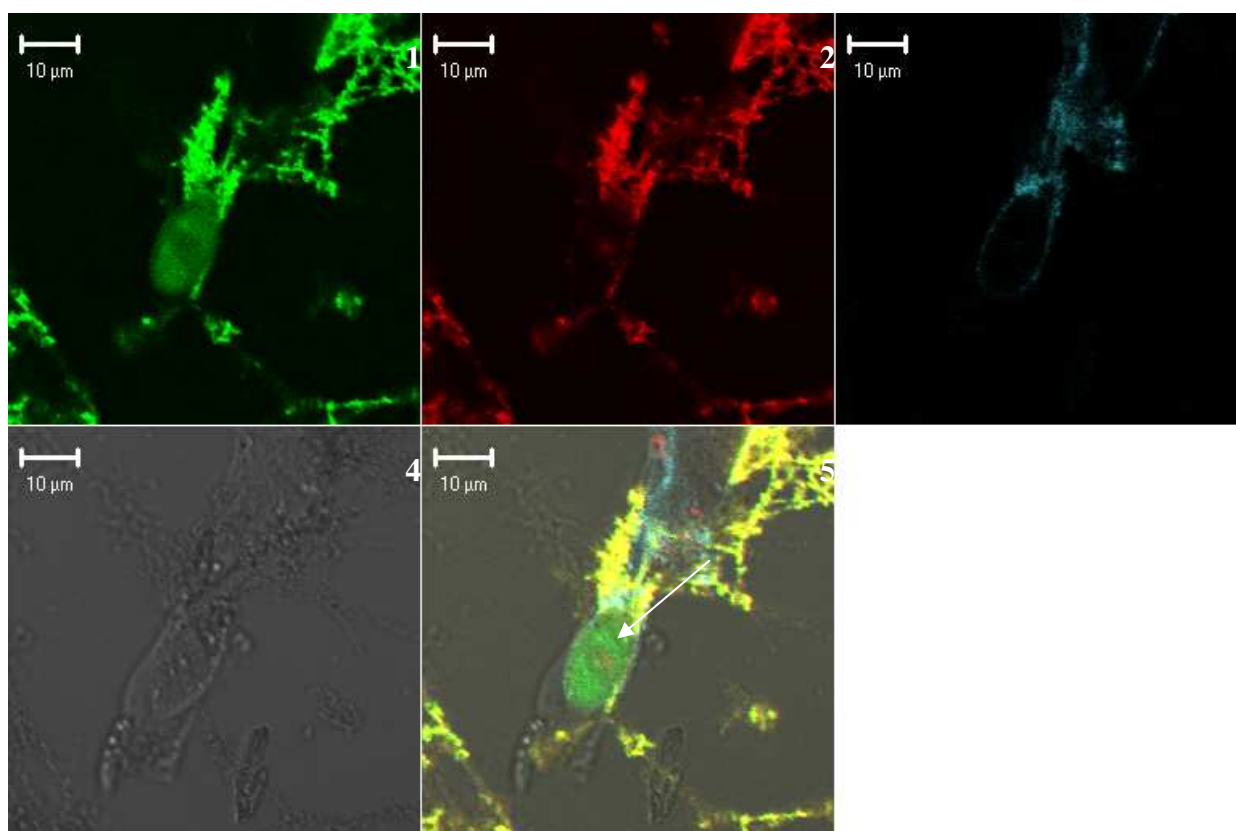


#### 4.2.4 Étude, par microscopie confocale, de l'internalisation des nanoparticules chitosane/siARN et leur décomplexation au niveau du cytosol

Nous avons démontré, par cytométrie de flux, la capacité du chitosane à livrer les siARN aux cellules HepG2. Il s'avère donc crucial de déterminer les voies de circulation et le destin des nanoparticules chitosane/siApoB et de leur cargo dans le cytosol. Il s'agit en fait de la séquestration endosomale, de l'échappement endosomale et du relargage des siARN. Les résultats présentés dans les **figures 4-14, 4-15 et 4-16** représentent les cellules HepG2 transfectées par les nanoparticules chitosane/siGLO après 24 h de transfection. Les siGLO verts sont des duplex d'oligonucléotides marqués par le fluorophore 6-FAM et sont des indicateurs permettant une évaluation visuelle de transfection chez les cellules de mammifères (Dharmacon, 2014). Le chitosane utilisé est marqué par la rhodamine (rouge). Les nanoparticules émettent la couleur jaune quand le chitosane marqué à la rhodamine (rouge) est colocalisé avec les siARN marqués au FAM (vert). La coloration visualisée est jaune suite au phénomène de colocalisation lors de la visualisation des différentes sondes fluorescentes. La membrane cellulaire marquée par CellMask™ émet une couleur bleue. L'excitation du FAM, de la rhodamine et du CellMask™ sont à des longueurs d'ondes de 494, 540 et 346 nm respectivement et leurs émissions est à des longueurs d'ondes de 520, 625 et 442 nm.

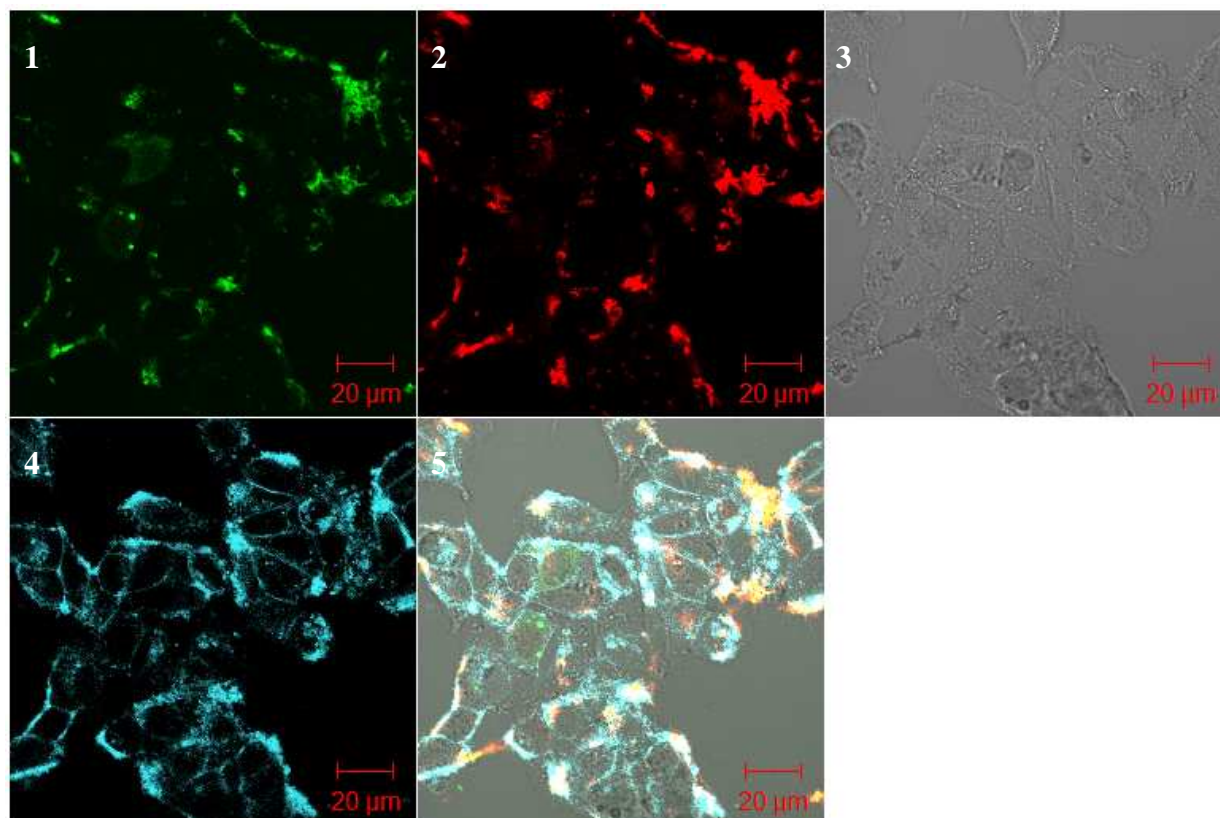
Les résultats présentés montrent que les nanoparticules chitosane/siGLO sont rentrées dans la cellule et les siARN se sont libérés dans le cytoplasme. Par contre, il existe des nanoparticules séquestrées dans des vésicules endosomales et lysosomales (**Figure 4-16**). L'étude de l'internalisation des nanoparticules chitosane 92-10-5/ADNp réalisée par notre groupe de recherche, montre que toutes les nanoparticules atteignent le lysosome après 12 heures de transfection et qu'ils échappent lentement de 12 à 48 heures (Thibault, M. et al., 2010).

De plus, les images des cellules HepG2 examinées par microscopie confocale montrent qu'une quantité de siARN libres se trouve dans le noyau de la cellule (**Figure 4-14**).



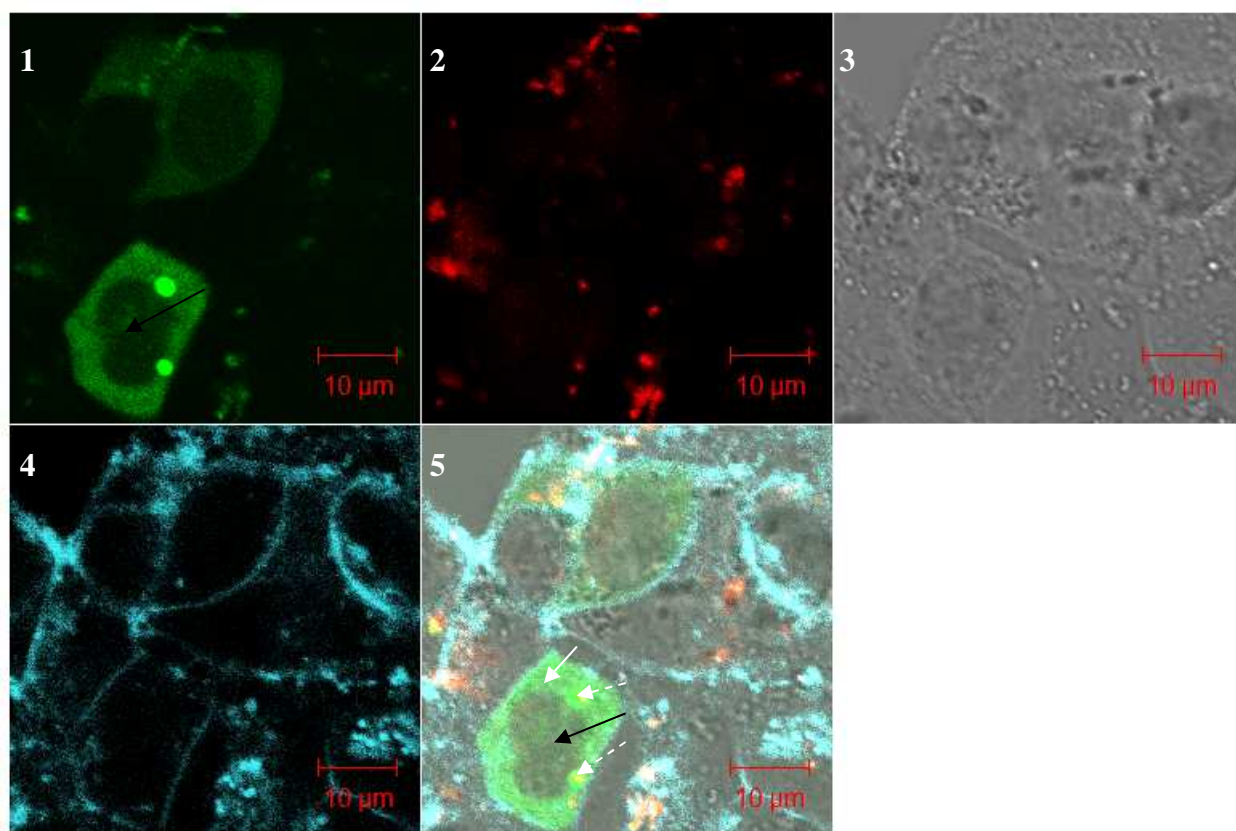
**Figure 4-14: Internalisation des nanoparticules chitosane 80-10-5/siGLO par les cellules HepG2 et libération des siARN à l'intérieur des cellules examinées par microscopie confocale**

Les cellules HepG2 ont été transfectées par des nanoparticules composées de chitosane 80-10-5 marqué par la rhodamine et complexé avec des siGLO qui sont des duplex d'oligonucléotides, marqueur fluorescent et indicateur de transfection chez les cellules des mammifères. Elles ont été examinées par microscopie confocale 24 heures après la transfection. Les siGLO sont marqués par 6-FAM et sont en vert (1), le chitosane marqué par rhodamine est en rouge (2), les membranes des cellules sont colorées par CellMask™ en bleu (4), et les nanoparticules chitosane (80-10-5)/siGLO sont en jaune (5). La superposition de tous les signaux est représentée dans la photo (5). Les cellules sans détection de fluorochromes sont représentées dans la photo (3). La flèche représente les siARN dans le cytoplasme.



**Figure 4-15: Internalisation des nanoparticules chitosane 92-10-5/siGLO par les cellules HepG2 et libération des siARN à l'intérieur des cellules examinées par microscopie confocale**

Les cellules HepG2 ont été transfectées par des nanoparticules composées de chitosane 92-10-5 marqué par la rhodamine et complexé avec des siGLO qui sont des duplex d'oligonucléotides, marqueur fluorescent et indicateur de transfection chez les cellules des mammifères. Elles ont été examinées par microscopie confocale 24 heures après la transfection. Les siGLO sont marqués par 6-FAM et sont en vert (1), le chitosane marqué par rhodamine est en rouge (2), les membranes des cellules sont colorées par CellMask™ en bleu (4), et les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siGLO sont en jaune (5). La superposition de tous les signaux est représentée dans la photo (5). Les cellules sans détection de fluorochromes sont représentées dans la photo (3).



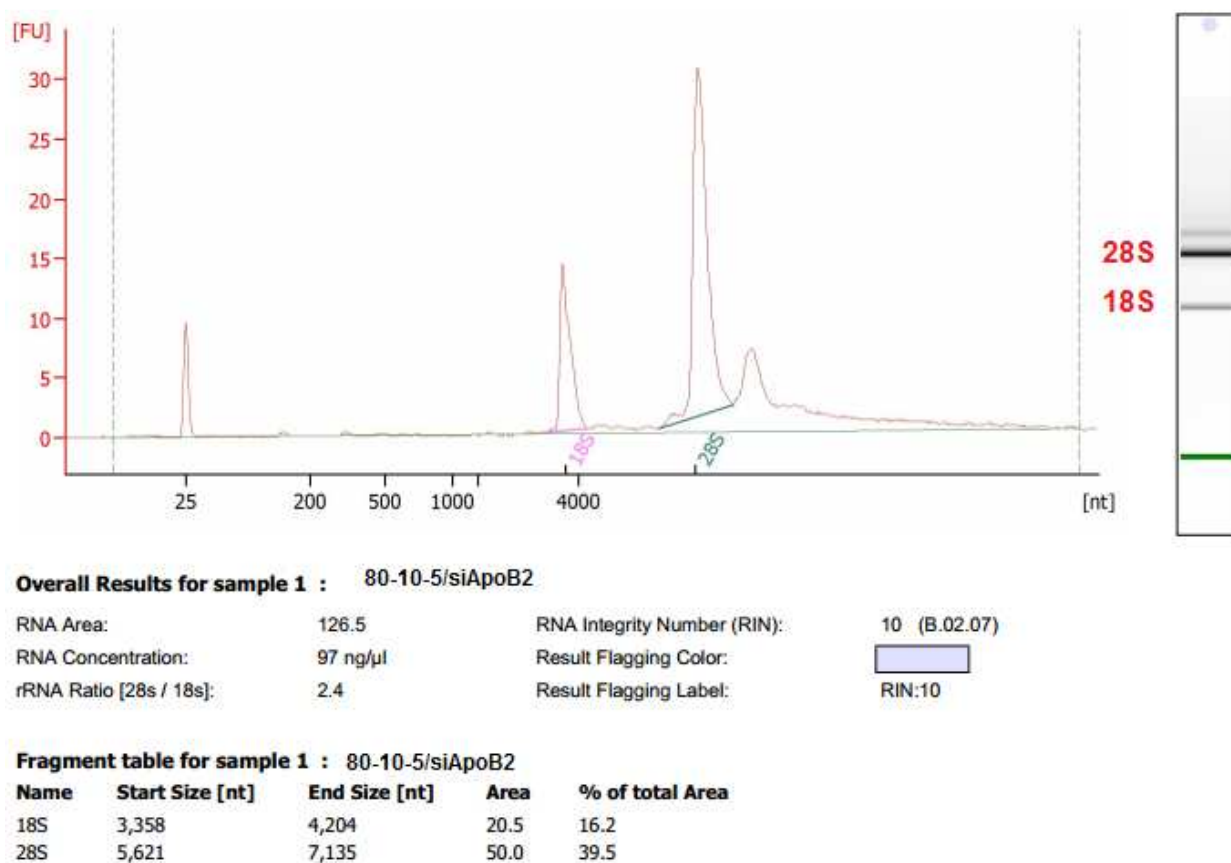
**Figure 4-16: Internalisation des nanoparticules chitosane 92-10-5/siGLO par les cellules HepG2 et libération des siARN à l'intérieur des cellules examinées par microscopie confocale (Zoom)**

Les cellules HepG2 ont été transfectées par des nanoparticules composées de chitosane 92-10-5 marqué par la rhodamine et complexé avec des siGLO qui sont des duplex d'oligonucléotides, marqueur fluorescent et indicateur de transfection chez les cellules des mammifères. Elles ont été examinées par microscopie confocale 24 heures après la transfection. Les siGLO sont marqués par 6-FAM et sont en vert (1), le chitosane marqué par rhodamine est en rouge (2), les membranes des cellules sont colorées par CellMask™ en bleu (4), et les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siGLO sont en jaune (5). La superposition de tous les signaux est représentée dans la photo (5). Les cellules sans détection de fluorochromes sont représentées dans la photo (3). Les flèches blanches normales représentent les siARN dans le cytoplasme, les flèches blanches pointillées représentent les nanoparticules chitosane/siARN qui sont probablement piégées dans l'endosome et la flèche noire présente le siARN dans le noyau de la cellule.

#### 4.2.5 Étude du silençage du gène ApoB par PCR en temps réel (qPCR) *in vitro*

Les cellules HepG2 ont été transfectées par les chitosanes 80-10, 80-40, 92-10 et 92-40 avec un ratio N : P égal à 5 complexés avec un des trois siApoB choisis (siApoB1, siApoB2 ou siApoB3). La transfection a été réalisée dans un milieu qui contient du sérum (FBS). L'agent de transfection commercialisé DharmaFECT® a été choisi comme un contrôle positif. La transfection avec les siARN nus a pour but de déterminer l'efficacité du système de livraison choisi qui est le chitosane. L'ARN total a été extrait à partir des cellules HepG2 transfectées après un traitement à la chitosanase. La chitosanase permet d'avoir un ARN extrait de meilleure qualité (Alameh et al., 2010).

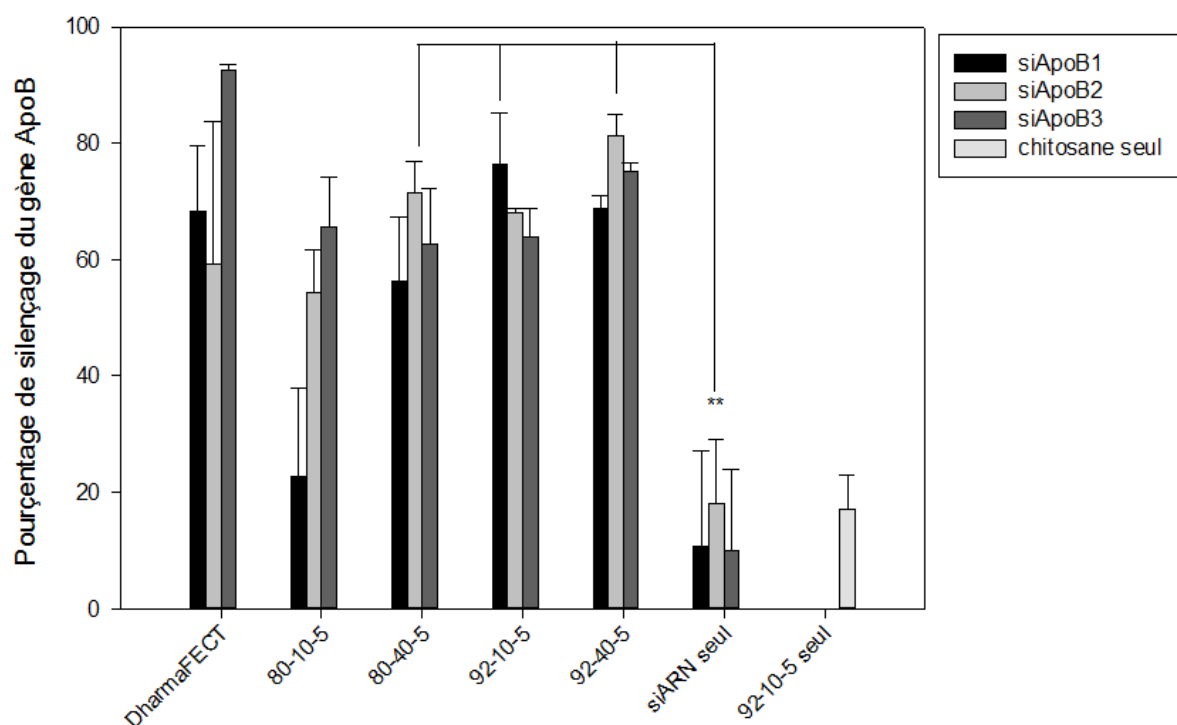
La qualité de l'ARN extrait a été vérifiée par électrophorèse capillaire microfluidique en utilisant Agilent 2100 Bioanalyzer. Le logiciel 2100 Bioanalyzer expert, utilisé pour interpréter les résultats, traduit la qualité des ARN en nombre d'intégrité de l'ARN RIN (*RNA Integrity Number*) en se basant sur le rapport 28S/18S de l'ARN ribosomique. Schroeder et al. ont confirmé que le RIN est le meilleur indicateur de la qualité de l'ARN (Schroeder et al., 2006). Le RIN (*RNA Integrity Number*) varie entre 1 et 10. Il permet de nous indiquer si l'échantillon est dégradé (RIN=1) ou intact et pur (RIN=10) (AgilentTechnologies, 2004). Une quantité importante des ARN 28S et 18S et une faible quantité de l'ARN 5S indiquent que l'ARN total est de bonne qualité. Par conséquent, l'ARN messenger (ARNm) est considéré de bonne qualité. Les RIN des ARN totaux extraits à partir des cellules HepG2 utilisées au cours de cette étude sont supérieurs ou égaux à 8. La qualité de l'ARN est considérée très bonne quand le RIN est supérieur à 8 (Fleige & Pfaffl, 2006). L'ARN extrait des cellules HepG2 de cette étude est alors de très bonne qualité et pourrait être utilisé pour la PCR en temps réel. La **figure 4-17** est un exemple d'un chromatogramme de l'électrophorèse capillaire d'un échantillon d'ARN de très haute qualité (RIN =10) extraits à partir des cellules HepG2 transfectées par les nanoparticules 80-10-5/siApoB2.



**Figure 4-17: Électrophérogramme d'un échantillon d'ARN de haute qualité (RIN=10) extrait à partir des cellules HepG2 transfectées par les nanoparticules chitosane 80-10-5/siApoB2**

L'ARN total a été chargé sur les puces «Nano 6000». Les résultats ont été ensuite analysés par le logiciel «2100 Bioanalyzer Expert». Le chromatogramme représente deux pics 18S et 28S de l'ARNr définies. L'aire du pic 28S est approximativement le double de celui du pic 18S. L'électrophorèse représente deux bandes distinctes 18S et 28S de l'ARNr. Pour un échantillon de bonne qualité, ces deux bandes doivent être visibles. Leur étalement est un indice de dégradation ou d'impureté.

Les résultats présentés sur la **figure 4-18** montrent que les différentes nanoparticules chitosane/siApoB induisent un silençage du gène ApoB qui varie entre 20 et 80%. Les meilleures formulations à livrer les trois siARN sont le 92-10-5 et le 92-40-5 avec une moyenne de silençage égale à 55 et 62% respectivement. Les tests statistiques prouvent que l'efficacité de silençage ne dépend pas de la masse moléculaire. En effet, il n'existe pas de différence significative entre l'efficacité des chitosanes à MM égale à 10 et ceux à MM égale à 40. Par contre, l'efficacité dépend du DDA. Le DDA faible diminue l'efficacité des chitosanes. Les nanoparticules à base de chitosane 80-10-5 et 80-40-5 induisent un silençage égal à 37 et 49 % respectivement. L'efficacité de silençage ne dépend ni des siApoB utilisés ni de leurs modifications chimiques. En effet, il n'existe pas de différence significative entre le pourcentage de silençage induit par les nanoparticules à base des siApoB1, siApoB2 ou siApoB3. De plus, l'efficacité du silençage des nanoparticules chitosane 92-40-5/siApoB (62,3%), 92-10-5 (55,25%) et 80-40-5 (49,94%) est comparable à celle du DharmaFECT/siApoB (62,4%).



**Figure 4-18: Silençage génique de l'ApoB mesuré par qRT-PCR chez les cellules HepG2 traitées avec les siApoB seuls, livrés par le chitosane ou par le DharmaFECT®**

L'ARN total a été extrait à partir des cellules HepG2 transfectées avec des nanoparticules de chitosane/siApoB et traitées par la chitosanase. Après la vérification de la qualité de l'ARN total par Bioanalyzer 2100. L'ARN a été rétrotranscrit. Le silençage du gène ApoB a été étudié par qRT-PCR. Les résultats ont été analysés par le logiciel Expression suite. La valeur du Ct du gène ApoB a été normalisée avec le gène du GAPDH endogène. Le logiciel compare ces valeurs à celle des cellules non transfectées. Le pourcentage d'expression a été déterminé en attribuant une expression de 100 % aux échantillons des cellules non transfectées. Le contrôle positif choisi est DharmaFECT® complexé avec chaque siApoB. Les contrôles négatifs sont le chitosane seul et les siApoB seuls. (N=2-3;  $p^{**} < 0,01$ )

### 4.3 Étude *in vivo*

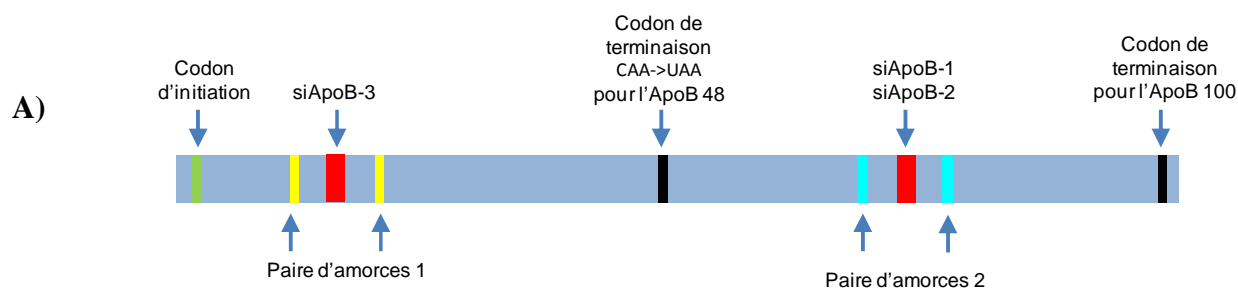
L'étude *in vivo* a été réalisée par Diogo Lopes De Jesus (De Jesus, 2011). Les souris C57BL/6 ont suivi une diète riche en gras et ont été traitées en même temps avec les nanoparticules chitosane 92-10-5/siApoB1. Dix groupes de souris ont été choisis: sept groupes (S1-S7) ont reçu trois injections de nanoparticules à différentes dates. Le groupe S8 a reçu une seule injection 48



heures avant l'euthanasie. Les 2 groupes contrôles n'ont reçu aucun traitement. Un de ces deux groupes a suivi une diète riche en gras et l'autre a suivi une diète normale. De Jesus a étudié l'efficacité des nanoparticules au niveau phénotypique en dosant l'apolipoprotéine B-100 dans le sang (**Tableau 4.2**). La présente étude a pour but de confirmer l'efficacité des nanoparticules chitosane 92-10-5/siApoB1 au niveau transcriptomique. Pour ce, les échantillons d'ARN extrait à partir des foies des souris par TRIzol® traitées ont été récupérés et analysés par PCR en temps réel.

### 4.3.1 Séquençage partiel du gène ApoB murin montrant les séquences cibles des siApoB

L'intégrité des séquences cibles spécifiques aux siARN utilisés a été confirmée par séquençage. Les ARNm ApoB extrait à partir du tissu des foies des souris a été rétrotranscrit en ADNc. Les résultats du séquençage de l'ADNc amplifié par PCR montrent que les séquences des siApoB1, des siApoB2 et des siApoB3 sont similaires à leurs parties cibles dans l'ARNm ApoB extrait (**Figure 4-19**). Ceci confirme l'intégrité des séquences codantes pour l'apolipoprotéine B exprimées dans le foie des souris utilisées.



```

1  tacctgcctg agctccgcct ccgaagaccc tgtagagcaa gcagcagggg ctaggcccg
61  ggccaggcca cagccaggaa gccacccac catccatccg ccatgggccc acgaaagcct
121 gccctgcgga cgccgttact gctgctgttc ctgctactgt tcttggacac cagcgtctgg
181 gctcaagatg aagtcctgga aaacttaagc ttcagctgtc caaaagatgc aactcgattc
241 aagcacctcc gaaagtacgt gtacaactat gaagctgaaa gttccagcgg tgtccagggc
301 acagctgact ccagaagcgc caccaagatc aactgtaagg tagagctgga ggtcccccaa
361 atctgtggtt tcatcatgag gaccaaccag tgtaccctta aagaggtgta tggcttcaac
421 cctgagggca aggccttgat gaagaaaacc aagaactctg aagagtttgc agctgccatg
481 tccaggtacg aactcaagct ggccattcct gaagggaac aaattgttct ttaccctgac
541 aaggatgaac ctaaataat cctgaacatc aagaggggca tcatctctgc tcttctggtt
601 cccccagaga cagaagagga ccaacaagag ttgttcctgg ataccgtgta tggaaactgc
661 tcaactcagg ttaccgtgaa ttcaagaaag ggaaccgtac caacagaaat gtccacagag
721 agaaacctgc agcaatgtga cggcttccag cccatcagta caagtgtcag ccctctcgct
781 ctcacaaag gcctgggtcca ccccttgtca actcttatca gcagcagcca aacttgccag
841 tacaccctgg atcctaagag gaagcatgtg tctgaagctg tctgtgatga gcagcatctt
901 ttcttgctt tctcctacaa gaataagtat gggatcatga cacgtgttac acagaaactg
961 agtcttgaag acacacctaa gatcaacagt cgcttcttca gtgaaggtag caaccggatg

```

```

1021 ggtctggcct ttgagagcac caagtccacg tcatccccaa agcaggctga tgctgttttg
1081 aagacccttc aagaactgaa aaaattgtcc atctcagagc agaatgctca gagagcaaat
1141 ctcttcaata aactggttac tgagctgaga ggccctcactg gtgaagcaat cacatccctc
1201 ttgccacagc tgattgaagt gtccagcccc atcactttac aagccttggg tcaagtgtgga
1261 cagccacagt gctatactca catcctccag tggctgaaaa ctgagaaggc tcacccctc
1321 ctgggttgaca ttgtcaccta cctgatggct ctgatcccaa atccctcaac acagaggctg
1381 caggaaatct ttaatactgc caaggagcag cagagccgag ccactctgta tgcactgagc
1441 cacgcagtta acagctattt tgatgtggac cattcaagga gccagttct gcaggatatt
1501 gctggttacc tgttgaaaca gatcgacaat gaatgcacgg gcaatgaaga ccacaccttc
1561 ttgattctga gggtcattgg aaatatggga agaaccatgg aacaagtaat gccagccctc
1621 aagtcctcag tcctgagctg tgtacgaagt acaaaacat ctctgctgat tcagaaagct
1681 gctctccagg ccctgaggaa gatggaactg gaagatgagg tccggacgat cttttttgat
1741 acatttgtaa atgggtgtgc tcccgtggag aagagactgg ctgcctatct cttgctgatg
1801 aagaaccctt cctcatcaga tattaacaaa attgcccaac ttctccaatg ggaacagagt
1861 gagcagggtga agaacttcgt ggcattctcac attgccaaac tcttgaactc ggaagaactg
1921 tatgtccaag atctgaaagt tttgatcaaa aatgctctgg agaattctca atttccaacg
1981 atcatggact tcagaaaatt ttcccgaac tatcagattt ccaaactctgc ttctctccca
2041 atgttcgacc cagtctcagt caaaatagaa ggggaatctta tatttgatcc aagcagttat
2101 cttcccagag aaagcttgct gaaaacaacc ctcacagtct ttggacttgc ttcacttgat
2161 ctctttgaga ttggtttga gaaggaaaagg tttgagccaa cactagaagc tctttttggt
2221 aagcaaggat tcttcccaga cagtgtcaac aaggctttgt attgggtcaa tggccgagtt
2281 ccagatggtg tctccaaggt cttggtggac cactttggct atactacaga tggcaagcat
//
6541 aattatagaa ttacagataa tgatgtacta attgccatag atagtgccaa aatcaacttc
6601 aatgaaaaac tctctcaact tgagacatac gcgatacaa ttgatcagta tattaagat
6661 aattatgatc cacatgactt aaaaagaact attgctgaga ttattgatcg aatcattgaa
//
9961 ccttcataca agttagtgt gccacccttg gagttgccag ttttccatgg tcttggaat
10021 ctattcaagt ttttctccc agatttcaag ggattcaaca ctattgacaa tatttatatt
10081 ccagccatgg gcaactttac ctatgacttt tcttttaaat caagtgtcat cacactgaat
10141 accaatgctg gactttataa ccaatcagat atcgttgccc atttcccttc ttctcttca
10201 tttgtcactg acgccctgca gtacaaatta gaggaacat cacgtctgat cgcgaaaggg
10261 ggattgaaac tagccacagc tgtctctcta actaacaat ttgtaaaggg cagtcatgac
//
13501 aactaccacg tgtttctcag atacatcacc gagttactga gaaagctgca ggtggccaca
13561 gccataaatg tgagccccta tataaagctt gctcaaggag agctgatgat caccttctga
13621 ttcattctact aacaaattca aattaaacct tcacatagta ggagactttg tagactacta
13681 taaagaccat cctgagccag acctgcagtc aacagcaaga gcaagaagca cataggaact
13741 atacctgcaa ccaagctggc ataagaacca agaccttcaa agcagcctga actcaagatg
13801 acatatttta caagttagag taaagtcaag agctgagttg ttttgtccaa ctgaggatgg
13861 agggaggagg ggaaggggaa ataaataaat acttccttat tgtgcagcaa aaaaaaaaaa
13921 aaaaaaaaaa a

```

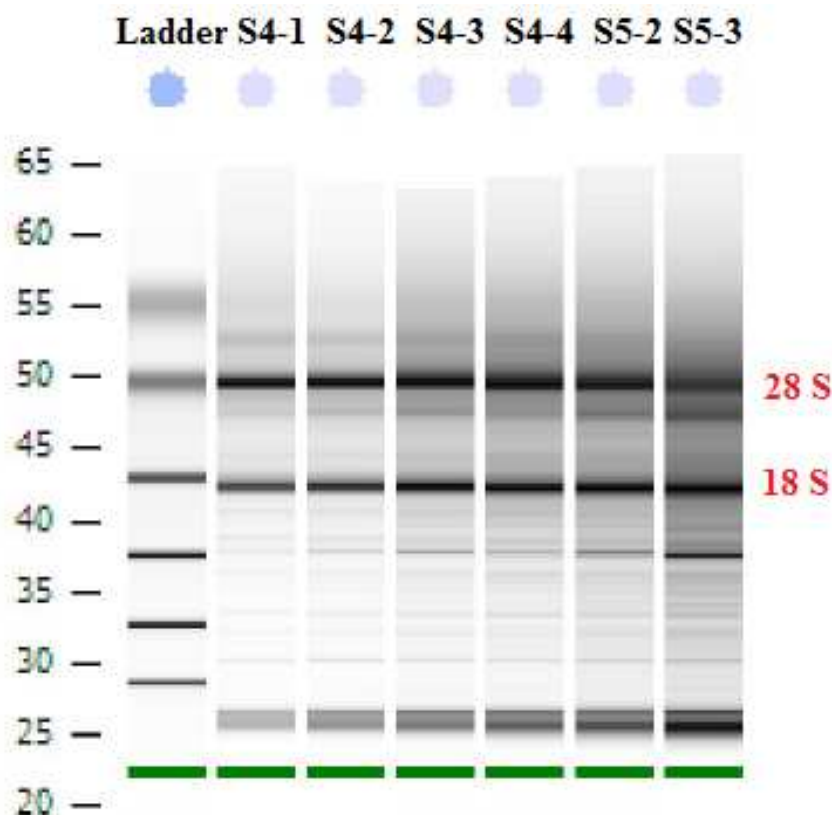
**Figure 4-19: Séquence nucléotidique de l'ARNm du gène ApoB murin. Référence NCBI de la séquence : NM\_009693.2**

(A) Le schéma et (B) la séquence détaillée de l'ARNm de l'ApoB murin. Les codons dans les encadrés correspondent, dans l'ordre, au site d'initiation (codon d'initiation) et au site de terminaison (codon-stop) de l'ApoB-48 et de l'ApoB-100. Les zones en jaune et cyan correspondent respectivement aux séquences d'hybridation des paires d'amorces 1 et 2 utilisées pour confirmer la présence du gène ApoB dans les cellules du foie des souris C57BL/6. Les soulignés correspondent aux régions séquencées en utilisant ces paires d'amorces. Les zones en

rouges correspondent, dans l'ordre, à la séquence ciblée par le siApoB3 puis celle ciblée par les siApoB1 et siApoB2. À noter que les siARN utilisés ciblent à la fois les ARNm de l'ApoB humain et murin.

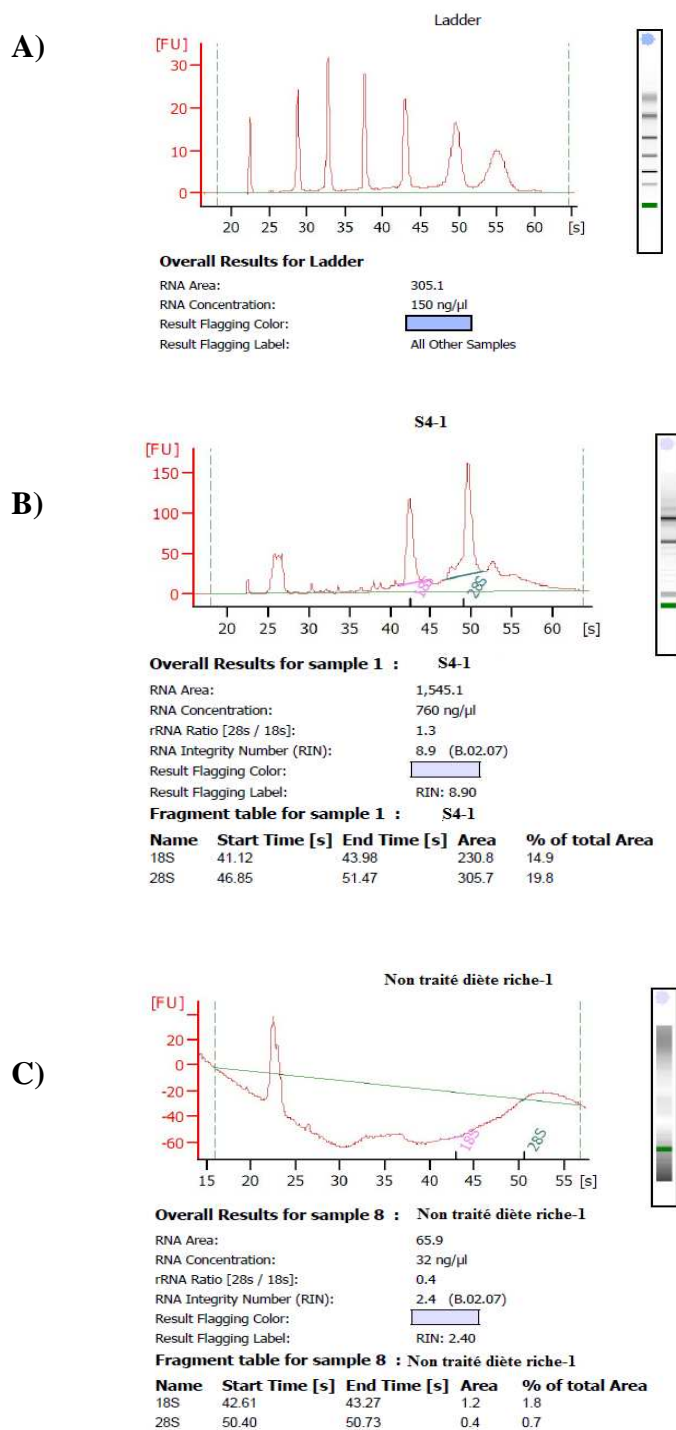
### 4.3.2 Silencage du gène ApoB, *in vivo*, par les nanoparticules chitosane 92-10-5/siApoB1

La qualité, la pureté et l'intégrité de l'ARN total extrait du tissu hépatique de souris ont été vérifiées par électrophorèse capillaire microfluidique (Agilent Bioanalyzer 2100) (**Figure 4-20**, **Figure 4-21**). Les résultats fournis par le système Agilent 2100 Bioanalyzer sont présentés sous forme de gel d'électrophorèse montrant les deux bandes 28S et 18S de l'ARN ribosomal qui permettent au logiciel de calculer le RIN. Une quantité importante des ARN 28S et 18S et une faible quantité de l'ARN 5S indiquent que l'ARN est intact. L'échelle de poids moléculaire est utilisée afin d'estimer la taille des bandes (Fleige & Pfaffl, 2006). La moyenne des RIN des ARN totaux murins est 5,8. La qualité de l'ARN est considérée bonne lorsque le RIN est supérieur à 5 et très bonne à partir de 8 (Fleige & Pfaffl, 2006). La figure est un exemple d'un chromatogramme de l'électrophorèse capillaire d'un échantillon d'ARN de haute qualité (RIN = 8,9). Cet échantillon a été extrait à partir du foie d'une souris qui a suivi une diète riche en gras et qui a reçu des injections de nanoparticules 92-10-5/siApoB1. Les pics 18S et 28S de l'ARN ribosomique (ARNr) sont bien définis sur le chromatogramme et sur l'électrophorèse. L'aire du pic 28S de l'ARN ribosomique est approximativement le double de celle du pic 18S pour tous les ARN de haute qualité (Sambrook, Russell, & Russell, 2001). En effet, quand le rapport 28S/18S tend vers 2, l'ARN est intact (Sambrook et al., 2001). La **figure 4-21 C** est un électrophérogramme de l'ARN des souris qui ont suivi une diète riche en gras, mais qui n'ont pas été traitées. Le RIN de cet échantillon est très faible (2,4). De plus, l'ARN est partiellement dégradé puisque les pics et les bandes ne sont pas définis (faible quantité) et le rapport 28S: 18S est faible (Mueller, Lightfoot, & Schroeder, 2004).



**Figure 4-20: Analyse par Bioanalyzer 2100 de la qualité de l'ARN total extrait à partir des foies des souris représentée sous forme de gel**

L'ARN total des échantillons de souris et l'échelle des poids moléculaires ont été chargés sur les puces «Nano 6000». Les résultats ont été ensuite analysés avec le logiciel «2100 Bioanalyzer Expert». Le gel montre les deux bandes distinctes qui correspondent aux 18S et 28S de l'ARN ribosomal. Pour un échantillon de bonne qualité, ces deux bandes doivent être visibles. Leur étalement est un indice de dégradation ou d'impureté. L'utilisation de l'échelle des poids moléculaires permet d'estimer la taille des bandes d'ARN.

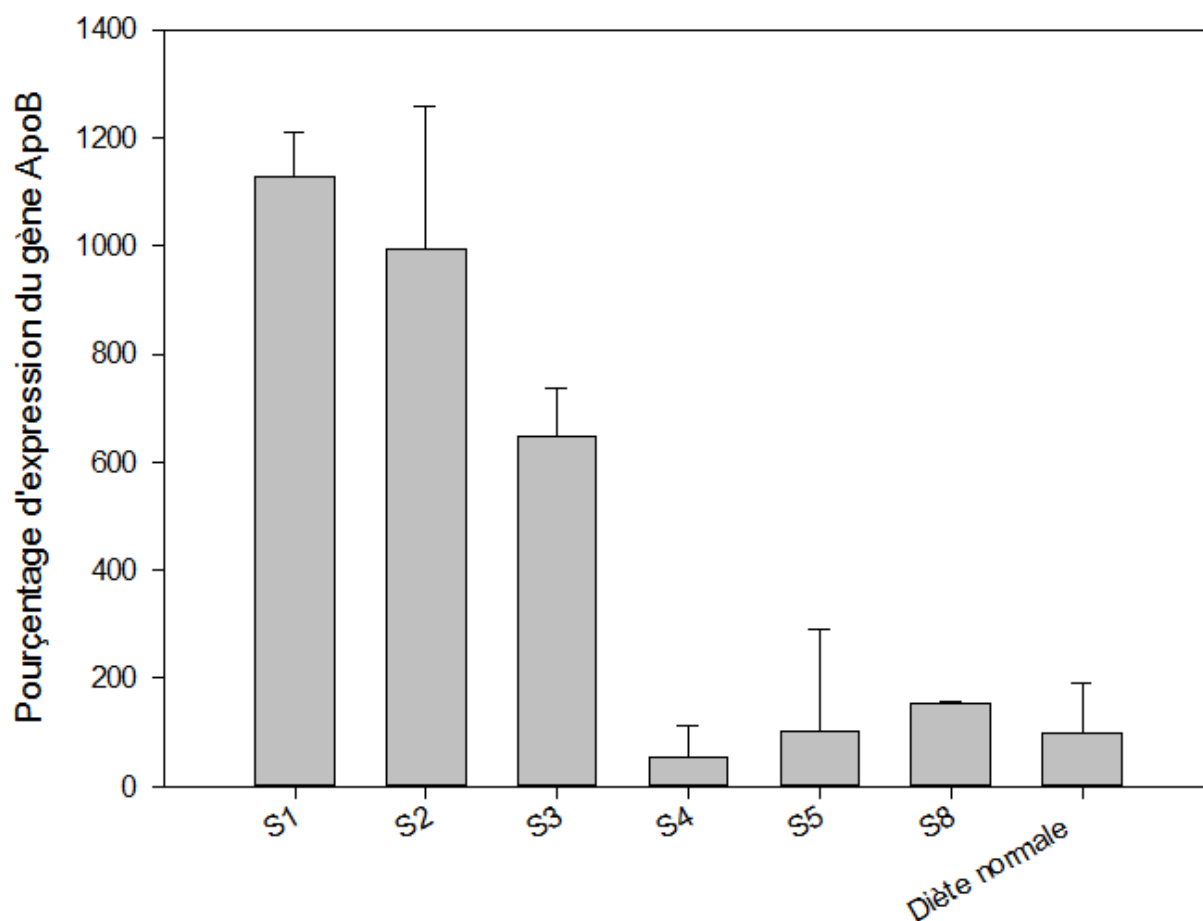


**Figure 4-21: Électrophérogramme de l'échelle des poids moléculaires (A), d'un échantillon d'ARN de haute qualité extrait à partir du foie de la souris S4-1 (RIN=8,9) (B) et d'un échantillon partiellement dégradé extrait du foie de la souris qui a suivi une diète riche sans recevoir aucun traitement (RIN=2,4) (C)**

L'ARN total des échantillons de souris et l'échelle des poids moléculaires ont été chargés sur les puces «Nano 6000». Les résultats ont été ensuite analysés avec le logiciel «2100 Bioanalyzer Expert». Le chromatogramme de l'ARN de haute qualité (**B**) représente deux pics 18S et 28S de l'ARN ribosomique (ARNr) définis. Le chromatogramme de l'ARN partiellement dégradé (**C**) représente une absence de pics 18S et 28S de l'ARNr définies. L'électrophorèse de l'échantillon (**C**) montre un étalement des bandes et une absence des bandes 18S et 28S de l'ARNr.

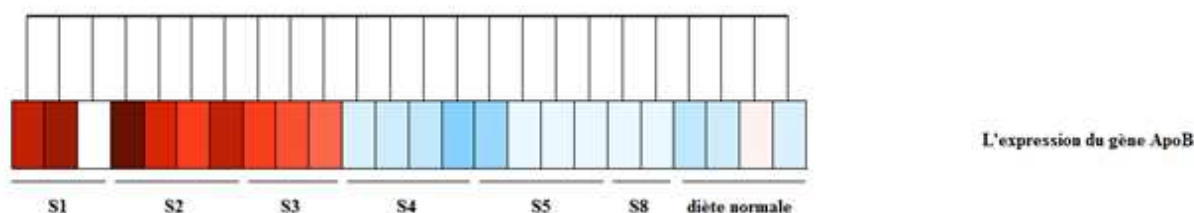
Les ARNm présents dans l'ARN total extrait ont été rétrotranscrits en ADNc avant d'être quantifiés par qPCR. La **figure 4-22** illustre la quantité relative des ARNm ApoB dans les tissus hépatiques issus des souris traitées par rapport à ceux issus de tissus de souris normales (groupe contrôle) et qui n'ont subi aucun traitement. La **figure 4-22** est une carte thermique qui présente l'expression du gène ApoB chez les souris contrôles et les souris traitées obtenue à l'aide de la corrélation Pearson. L'expression élevée du gène ApoB est représentée en rouge et la faible expression en bleu. Les groupes S1, S2 et S3 ont reçu leur traitement après 0, 1 et 2 semaines de la période d'acclimatation. Le taux d'ARN messenger diminue quand le traitement est plus proche de l'euthanasie. De même pour S4 et S5 qui ont atteint un niveau d'ARNm ApoB très proche de celui des souris en "santé" (100%). Les souris S4 et S5 ont reçu leur première injection au début de la semaine 4 et la semaine 5 après l'acclimatation respectivement. Cela veut dire que l'injection des nanoparticules permet de rétablir le niveau de l'ApoB, mais le taux de l'ApoB augmente de nouveau en arrêtant le traitement et en continuant la diète riche en gras.

Le groupe S5 a reçu trois injections, la dernière injection a été effectuée 2 semaines avant l'euthanasie. Le niveau de l'ARNm ApoB pour ce groupe (103 %) est 11 fois moins que celui du groupe S1 (1129%), qui a reçu sa dernière injection 7 semaines avant l'euthanasie. Quant au groupe S8 qui a reçu une seule injection 48 heures avant l'euthanasie, il a atteint un niveau d'ApoB normale (152%). Donc une seule dose est suffisante pour réduire l'expression de l'ApoB au moins à court terme. Le **tableau 4.2** montre que le taux de l'ApoB-100 chez toutes les souris traitées est comparable à celui chez les souris saines (De Jesus, 2011). Donc, les siApoB1 livrés par le chitosane 92-10-5 sont capables de réduire le taux de l'ARNm ApoB ainsi que la protéine ApoB-100.



**Figure 4-22: Silençage du gène ApoB chez les souris traitées par des nanoparticules chitosane 92-10-5/siApoB1**

L'ARN total a été extrait à partir des foies des souris traitées par les nanoparticules chitosane 92-10-5/siApoB1 et qui ont suivi durant toute l'étude une diète riche en gras. Les groupes se différencient par la date et le nombre d'injections. Toutes les souris ont été euthanasiées à la même période (51, 52 et 53 jours après la semaine de l'acclimatation). Après la vérification de la qualité de l'ARN total par Bioanalyzer 2100, l'ARN a été rétrotranscrit. Le silençage du gène ApoB a été étudié par qRT-PCR. Les résultats ont été analysés par le logiciel Expression suite. La valeur du Ct du gène ApoB a été normalisée avec le gène du GAPDH endogène. Le logiciel compare ces valeurs à celles du groupe biologique de référence. Le groupe de référence choisi est les souris saines qui n'ont reçu aucun traitement et qui ont suivi une diète normale (groupe contrôle). Le pourcentage d'expression a été déterminé en attribuant une expression de 100 % aux échantillons des souris du groupe contrôle. (n=2-4;  $P^* < 0,05$ ;  $P^{**} \leq 0,01$ ) + ou – max et min



**Figure 4-23: La carte thermique, selon la méthode de regroupement d'une seule liaison, de l'expression du gène ApoB chez les souris suivant une diète riche en gras traitées par les nanoparticules chitosane/siApoB.**

L'expression du gène ApoB a été étudiée par qRT-PCR. La distance entre les valeurs de l'expression du gène obtenu est mesurée à l'aide de la corrélation de Pearson. La corrélation de Pearson permet de savoir s'il y a une relation linéaire entre les variables. Sur la carte thermique, l'expression élevée du gène ApoB est représentée en rouge et la faible expression en bleu. Chaque groupe de souris contient de 2 à 4 souris. Les groupes S1, S2, S3, S4 et S5 sont des souris qui ont suivi une diète riche et qui ont été injectées 3 fois par des nanoparticules chitosane/siApoB avec une dose de siARN égale à 1mg/kg. Les périodes des injections diffèrent d'un groupe à l'autre. Les groupes S1, S2, S3, S4 et S5 ont été injectés une fois par semaine pendant 3 semaines à partir des semaines 1, 2, 3, 4 et 5 respectivement. Le groupe S8 a été injecté une seule fois 48 heures avant l'euthanasie des souris. Le seul groupe de souris qui a suivi une diète normale a été injecté 3 fois par PBS. Ce groupe a été considéré comme un contrôle négatif.



**Tableau 4.2 : Réduction de la protéine ApoB-100 dans le sang (De Jesus, 2011) et du niveau de l'expression du gène ApoB chez les souris traitées par les nanoparticules chitosane 92-10-5/siApoB1**

<b>Groupes</b>	<b>ARNm ApoB (100%)</b>	<b>Protéine ApoB-100 (100%)</b>
<b>S1</b>	1129,10 ± 77,20	118 ± 5,31
<b>S2</b>	995,10 ± 240,20	67,20 ± 4,41
<b>S3</b>	648,70 ± 81,60	74,74 ± 2,70
<b>S4</b>	52,70 ± 44,55	139,98 ± 19,06
<b>S5</b>	102,90 ± 128,05	135,14 ± 2,37
<b>S8</b>	152,30 ± 5,1	99,08 ± 21
<b>Souris saines</b>	100 ± 70,2	100 ± 7,66

## CHAPITRE 5 DISCUSSION

Bien que les siARN présentent un nouveau traitement prometteur contre plusieurs maladies, leur utilisation est limitée par leur répulsion électrostatique avec la barrière cellulaire polyanionique qui les empêche de la franchir par un mécanisme de diffusion passive. De plus, les siARN peuvent se dégrader suite à la digestion des enzymes qui se trouvent dans le plasma ou être éliminés par les reins (Watanabe et al., 2009). Pour surmonter ce défi, plusieurs systèmes de livraison viraux et non viraux ont été développés.

Dans le cadre de cette étude, le chitosane a été choisi pour livrer différentes séquences de siARN capables de silencer l'expression génique de l'ApoB et par conséquent la production de la protéine apolipoprotéine B, molécule structurante des plaques athérogéniques responsables du développement de l'athérosclérose.

L'utilisation des siARN pourrait nous confronter à d'autres défis tels que l'inhibition des effets hors cible et de la stimulation du système immunitaire. À cet effet, les siARN sont conçus et choisis de telle sorte qu'ils n'aient pas une homologie avec d'autres gènes autre que le gène cible.

La modification chimique joue un rôle important dans l'amélioration de la stabilité des siARN, la protection contre la digestion des nucléases et l'inhibition des effets hors cible. Nous avons utilisé trois siARN ciblant le gène ApoB qui sont constitués de 21 nucléotides dans le brin sens et 23 nucléotides dans le brin antisens avec un dépassement de 2 nucléotides à l'extrémité 3' du brin antisens. SiApoB1 et siApoB2 sont la même séquence (position 10167-10187, NM\_000384). SiApoB1 n'est pas modifié chimiquement, alors que siApoB2 contient 2 nucléotides modifiés par 2'-O-méthylation et 3 liaisons phosphotioates sur le brin antisens et une liaison phosphotioate sur le brin sens. SiApoB3 (position 2098-2118, NM\_000384) contient 8 modifications par 2'-O-méthylation et 2 liaisons phosphotioates sur le brin antisens. Le brin sens contient 7 nucléotides 2'-O-méthylés et une liaison phosphotioate.

Nous avons réussi à obtenir des nanoparticules en complexant les différents siARN avec différentes formulations de chitosane. Les nanoparticules chitosane/siARN obtenues ont été caractérisées pour prédire leur comportement avec les cellules et au sein des organismes vivants. Leur toxicité ainsi que leur efficacité ont été aussi étudiées *in vitro* et *in vivo*. Nous avons

comparé les siARN modifiés et non modifiés protégés par le chitosane de point de vue de ces deux derniers paramètres.

## 5.1 Caractérisation physicochimique des nanoparticules chitosane/siApoB

L'interaction des nanoparticules chitosane/siARN avec les protéines sanguines et avec les différentes composantes du système immunitaire ainsi que leur interaction avec la surface cellulaire (l'internalisation dans la cellule cible) *in vitro* et *in vivo* dépendent de leurs caractéristiques physicochimiques notamment la taille, le potentiel  $\zeta$  et la forme (Orr et al., 2007; Rejman, Oberle, Zuhorn, & Hoekstra, 2004; Zolnik et al., 2010). La taille de toutes les nanoparticules utilisées dans cette étude a été déterminée par DLS. Les résultats montrent que toutes les nanoparticules possèdent un diamètre hydrodynamique qui varie entre 71 et 135 nm. Leurs tailles diffèrent de la taille rapportée par Liu et al. (Liu, X. et al., 2007). En effet, Liu et al. a démontré que le diamètre des nanoparticules chitosane/siARN avec un chitosane de faible MM et avec un DDA élevé (95-9) mesure 3500 nm (Liu, X. et al., 2007). Nos résultats montrent que le diamètre des nanoparticules chitosane 92-10-5/siApoB ne dépasse pas 120 nm. De même, les travaux de Malmo et al. ont démontré que la taille des nanoparticules chitosane/siARN est inférieure à 100 nm (Malmo et al., 2011). La taille des nanoparticules polymères cationiques/acides nucléiques pourrait être un critère pour déterminer la voie d'internalisation. Les particules de taille entre 50 et 80 nm sont généralement internalisées par voie caveolae alors que les particules de taille entre 100 et 150 nm rentrent dans la plupart des cas par voie de clathrine (Bishop, 1997). Une cavéole est une invagination de la membrane plasmique de 50 à 100 nm, riche en cholestérol, en sphingolipide et en cavéoline (Krajewska & Maslowska, 2004; Rejman et al., 2004). La clathrine est une protéine qui couvre certaines vésicules dans la cellule. Ces vésicules contenant une particule quelconque se ferment et se détache de la membrane plasmique. Ils perdent ensuite le manteau constitué de clathrine pour devenir un endosome précoce. L'endosome précoce fusionne avec l'endosome tardif qui fusionne à la fin avec le lysosome (Harvey Lodish, A. B., Paul Matsudaira, James Darnell, 2004).

La taille des nanoparticules chitosane/siApoB utilisées dans ce projet est idéale pour l'endocytose (Rudzinski & Aminabhavi, 2010). Effectivement, la majorité des cellules peuvent endocyter les particules de tailles inférieures à 150 nm (Guy, Drabek, & Antoniou, 1995). Douglas et al. confirme que le mode principal de l'internalisation des nanoparticules chitosane/ADN est l'endocytose (Douglas, Piccirillo, & Tabrizian, 2008). Il existe plusieurs voies

d'endocytose pour l'internalisation de nanoparticules formées par du chitosane et des acides nucléiques (Douglas et al., 2008; Shu-Fen Peng, 2011). Il existe des études qui montrent que la voie médiée par clathrine n'est pas impliquée dans l'internalisation des nanoparticules chitosane/ADN. La majorité de ces nanoparticules sont internalisées par caveolae et une petite fraction par macropinocytose (Shu-Fen Peng, 2011). Huang et al. montrent que l'internalisation des nanoparticules chitosane/siARN est essentiellement par endocytose adsorptive suite à des interactions non spécifiques entre la membrane et les particules et partiellement par voie clathrine (Huang, Ma, Khor, & Lim, 2002). Une étude comparative a été faite sur trois lignées cellulaires transfectées par du chitosane/ADN. Il a été démontré que la voie de l'internalisation est dépendante de la lignée cellulaire. Les CHO internalisent les nanoparticules par la voie caveolae alors que les cellules 293T les internalisent par la voie clathrine (Douglas et al., 2008). Alameh et al. ont montré que même l'efficacité de transfection peut également dépendre de la lignée cellulaire (Alameh et al., 2012). Dans notre projet de recherche, les nanoparticules préparées, de par leur taille, sont des candidats à une internalisation par ces deux voies principales. De plus, les cellules du foie qui ont une structure endothéliale sinusoïdale peuvent permettre un passage libre des nanoparticules inférieures à 100 nm (Kim, T. H. et al., 2004). D'autre part, les résultats montrent que la taille des nanoparticules augmente avec l'augmentation de la MM. Katas et al., ont confirmé la corrélation entre la taille des nanoparticules chitosane/siARN et la masse moléculaire (Katas & Alpar, 2006). Les caractéristiques intrinsèques du chitosane varient selon ses paramètres physicochimiques, notamment le degré de désacétylation. La mesure de la taille des nanoparticules chitosane/siARN par DLS montre que l'augmentation de DDA de 80 à 92 n'a aucun effet sur la taille des nanoparticules. La taille des nanoparticules formées par du chitosane/siApoB1 ne diffère pas de la taille des nanoparticules chitosane/siApoB2. Cela signifie qu'une légère modification chimique des siARN n'influence pas la taille des polyplexes. Le diamètre hydrodynamique des nanoparticules chitosane/siApoB3 est plus grand que les deux autres. Les siApoB3 contiennent une liaison phosphotioate et 7 méthylations sur le brin sens, 2 liaisons phosphotioates et 8 méthylations sur le brin antisens alors que les siApoB2 ne contiennent que 3 méthylations et 2 liaisons phosphotioates en tout sur les deux brins. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la modification chimique pourrait influencer l'interaction entre les siARN et le chitosane. De plus, les liaisons phosphodiester sont achirales et le remplacement de l'atome d'oxygène par le soufre dans la liaison phosphotioate crée un centre de chiralité, d'où l'existence de plusieurs isomères (Rabiller, 1999). De façon

générale, la taille des nanoparticules chitosane/siApoB leur permet d'échapper à la phagocytose (Bruce Alberts, 2002; Dobrovolskaia & McNeil, 2007; Zolnik et al., 2010) et aussi d'éviter le système réticuloendothélial du foie (Kim, Y. et al., 2011). D'autre part, les tailles des nanoparticules mesurées par ESEM sont inférieures à celles mesurées par DLS. Selon Lou et al., cette augmentation de la taille pourrait être due aux conditions de préparation des nanoparticules. En effet, les nanoparticules utilisées pour la DLS sont dans un état hydraté ce qui augmente leurs tailles (Lou, Peng, Chen, Wang, & Leong, 2009). Les résultats de l'ESEM montrent aussi que les nanoparticules chitosane siApoB sont sphériques. Ceci est supporté par les travaux de Ji et al. Et de Howard et al. (Howard et al., 2006; Ji et al., 2009)

Les nanoparticules chitosane/siApoB possèdent une charge qui varie entre +19 et +31 mV. De nombreuses études utilisant des nanoparticules chitosane/siARN ont montré que leurs potentiels  $\zeta$  sont de la même échelle (Holzerny et al., 2012; Howard et al., 2006; Liu, X. et al., 2007). Cette charge positive assure l'interaction des nanoparticules avec la membrane cellulaire (Orr et al., 2007). De plus, elle prévient leur agrégation (Katas & Alpar, 2006). Le potentiel  $\zeta$  nous donne une idée sur la présence de forces répulsives et sur la stabilité des nanoparticules à long terme (Zhu et al., 2013). Le potentiel  $\zeta$  ne semble être influencé ni par la modification chimique des siARN ( $P=0,131$ ) ni par le DDA ( $P=0,129$ ), dans notre cas. La moyenne du potentiel  $\zeta$  des nanoparticules composées de chitosane avec un DDA égal à 10 est  $26,922 \pm 3,789$  mV et celle des nanoparticules composées de chitosane avec un DDA égal à 40 est  $23,449 \pm 3,465$  mV. Ceci pourrait être dû au fait que la différence entre un DDA égal à 80 et un DDA égal à 92 n'est pas très importante.

L'étude de la stabilité des nanoparticules à base de chitosane a pour but d'étudier la liaison entre le chitosane et les siARN dans les conditions de transfection cellulaire. La livraison des siARN jusqu'aux cellules cibles et leur protection par le chitosane dans le milieu extracellulaire dépend aussi de la stabilité des nanoparticules (Liu, X. et al., 2007). Nous avons étudié la stabilité du chitosane/siApoB pendant 3 temps d'incubation (0,5, 4 et 20 heures) dans un tampon à pH 6,5. Le pH choisi est égal au pKa du chitosane. Dans une solution à pH égal à son pKa intrinsèque, le chitosane est protonné ce qui lui permet d'acquérir des charges positives et se complexer avec les siARN chargés négativement. Après l'incubation des nanocomplexes, les siARN libres sont marqués avec le RiboGreen<sup>®</sup>. Les résultats montrent que le chitosane forme des nanoparticules stables quand il est complexé avec les différents siApoB à pH 6,5. Les résultats de cette étude

montrent que les chitosanes à faible MM et possédant un DDA élevé sont stables (92-10 et 92-40). En effet, un faible DDA minimise la stabilité des nanoparticules et l'attachement des siARN avec le chitosane puisque le chitosane à faible DDA est moins chargé positivement (Kiang, Wen, Lim, & Leong, 2004). À 30 minutes d'incubation, les nanoparticules formées qui ont un ratio amine (chitosane) phosphate (siARN) (N : P) égal à 10 sont plus stables que les nanoparticules qui ont un ratio N:P égal à 5. Après 4 et 20 heures d'incubation, le ratio N : P n'influence plus la stabilité. Les nanoparticules composées de chitosane avec un ratio N : P égal à 5 et 10 ont présenté la même stabilité. Notre groupe de recherche, a montré que l'excès de chitosane, quand le N : P est égal à 5, augmente l'absorption des nanoparticules par les cellules. Par contre, l'augmentation du ratio N : P de 5 à 10 peut même réduire l'efficacité de transfection (Thibault, Marc et al., 2011). C'est pourquoi le ratio N : P 5 a été choisi pour les expériences ultérieures. La modification chimique des siARN n'a pas présenté un obstacle pour qu'ils se complexent avec le chitosane. Bien au contraire, elle a amélioré la stabilité des nanoparticules. Les nanoparticules formées par les siApoB1 sont moins stables que celles formées par les siApoB2 et siApoB3. Pour un meilleur silençage du gène cible, il est crucial d'avoir une balance entre la stabilité et le désassemblage des nanoparticules chitosane/siARN. Le chitosane a pour rôle de protéger les siARN dans le milieu extracellulaire, de les livrer à l'intérieur des cellules et de les protéger dans les compartiments endosomale-lysosomale. Par contre, une stabilité importante peut empêcher le désassemblage des nanocomplexes et l'interaction des siARN avec le complexe RISC (Liu, X. et al., 2007). Le silençage du gène cible est initié par l'interaction du complexe siRISC qui contient le brin antisens du siARN et le complexe RISC avec l'ARNm pour le cliver (Rana, 2007; Tang, 2005).

La protection des siARN par le chitosane contre la digestion des ARNase a été étudiée en utilisant le test RiboGreen®. Les nanoparticules chitosane 92-10-5/siApoB sont incubés dans différentes solutions de concentrations physiologiques croissantes d'ARNase A. Le chitosane est ensuite digéré par la chitosanase et les siARN libérés sont marqués par le RiboGreen®. Le RiboGreen® émet une fluorescence quand il est lié à l'ARN intact (Jones, Yue, Cheung, & Singer, 1998).

Les tests statistiques montrent qu'il n'existe pas de différence significative entre la dégradation des siARN nus et la dégradation des siARN protégés par le chitosane ( $P = 0,341$ ). Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'ARNase, en forte concentration dans la solution, rentrerait en

compétition avec le chitosane complexé avec les siARN et pourrait le décrocher. Dans notre cas, les ARNase sont chargés positivement. De façon générale, les protéines sont chargées positivement quand le pH de la solution est inférieur à leur pH isoélectrique (Randoux, 1997). Le pH du tampon utilisé est égal à 6,5 et le pH isoélectrique de l'ARNase A utilisée est égal à 9.

De plus, les siARN ne sont pas totalement enveloppés par le chitosane. Ils dépassent les chitosane puisqu'ils ont une structure différente des ADN plasmidique, totalement couvert par le chitosane. Les siARN ont une structure rigide et de petite taille. Ce qui peut donner accès aux ARNase pour dégrader les siARN complexés (Al-Qadi et al., 2012; Gary, Puri, & Won, 2007; Lee, Dong Wook et al., 2009; Mao et al., 2010).

Le test de RiboGreen<sup>®</sup> ne nous a pas permis de détecter une différence de dégradation par la digestion des ARNase entre les différents siARN. Les modifications chimiques des siARN ne semblent pas les stabiliser contre la dégradation de l'ARNase A. Ces résultats corrélerent avec les résultats de Braasch et al. qui ont trouvé que la substitution des liaisons phosphodiester des siARN en liaisons phosphotioates n'a pas amélioré la stabilité des siARN contre la digestion de l'ARNase (Braasch et al., 2003). Par contre, il existe plusieurs autres avantages de l'utilisation des siARN ou des oligonucléotides antisens modifiés chimiquement comme l'augmentation de la spécificité et l'amélioration de la pharmacocinétique et de la biodistribution. Les modifications chimiques permettent aussi les liaisons avec les protéines du sérum ce qui prolonge la demi-vie *in vivo* en réduisant la clairance (Behlke, 2008; Braasch et al., 2003; Geary et al., 2001)

## **5.2 Silencage spécifique, *in vitro*, du gène ApoB médié par les nanoparticules chitosane/siApoB en utilisant les cellules hépatiques HepG2**

L'objectif des expériences *in vitro* est de déterminer le potentiel des nanoparticules formées de différentes formulations de chitosane et de différentes séquences de siARN pour silencer efficacement le gène ApoB dans des cellules hépatiques, les cellules ciblées par le traitement, tout en étant non toxique. Toutes les expériences réalisées *in vitro* ont confirmé que le chitosane peut livrer efficacement les trois différents siApoB dans les cellules HepG2. Les expériences ont aussi démontré que les nanoparticules chitosane/siApoB testées sont moins cytotoxiques que les nanoparticules à base de lipide comme le DharmaFECT<sup>®</sup>. La moyenne de la viabilité des cellules transfectées par DharmaFECT<sup>®</sup>/siApoB est  $43,31 \pm 1,64$  % alors que celle des cellules transfectées par chitosane/siApoB est égale à  $71,42 \pm 4,2$  %. La toxicité des nanoparticules

chitosane/siApoB pourrait être due à l'utilisation du milieu de transfection. En effet, nous avons utilisé les mêmes conditions de transfection pour les cellules transfectées avec des siApoB seuls. La viabilité pour cette condition est  $63,34 \pm 1,6\%$ . Le chitosane semble même améliorer la viabilité des cellules transfectées puisque la viabilité des cellules transfectées avec les nanocomplexes est supérieure à celle avec les siARN seuls. De plus, nous avons démontré que le silençage du gène ApoB par les nanoparticules chitosane/siApoB peut atteindre 75%. Il s'agit d'un pourcentage de silençage comparable à celui obtenu avec le contrôle positif DharmaFECT®.

La cytométrie en flux a permis d'étudier l'internalisation des nanoparticules dans les cellules HepG2. Les nanoparticules les moins stables (80-10-5/siApoB) sont aussi celles qui montrent la plus faible internalisation avec un pourcentage d'internalisation des cellules HepG2 qui ne dépasse pas 80%. Les résultats obtenus démontrent que l'efficacité de transfection s'accroît avec l'augmentation du degré de désacétylation. Ainsi, 92-40-5 est la formulation qui a montré un plus grand taux d'internalisation dans les cellules HepG2 (99,5 %). Un DDA élevé permettrait d'augmenter la charge positive des nanoparticules ce qui faciliterait l'interaction avec la membrane cellulaire, chargée négativement et faciliterait ainsi leur internalisation. Plusieurs études ont montré que l'efficacité de transfection est plus importante lorsque le DDA du chitosane utilisé est plus élevé (Huang et al., 2005; Liu, X. et al., 2007; Strand et al., 2005). Le chitosane 92-40-5 est plus efficace que le contrôle commercialisé DharmaFECT® pour la transfection des cellules HepG2. D'autres chercheurs ont démontré que le chitosane est plus efficace que le contrôle Lipofectamine® pour la livraison des siARN (Mittnacht et al., 2010) et aussi plus efficace que le DharmaFECT® pour livrer les ODN-ApoB (Alameh et al., 2012).

L'étude par cytométrie en flux prouve qu'il n'existe pas de différence significative notable entre les formules de chitosane 80-40-5, 92-10-5 et 92-40-5 de point de vue du pourcentage des cellules transfectées. En effet, l'étude d'Alameh et al. a montré que l'internalisation des nanoparticules ne dépend pas de la formulation du chitosane utilisée, mais plutôt du type des cellules (Alameh et al., 2012). La **figure 4.12** montre clairement que le pourcentage de transfection des cellules HepG2 par le chitosane/siApoB est supérieur à 80% voire 92% pour certaines formulations. Ce signal pourrait inclure les siARN complexés avec le chitosane qui sont adsorbés à la surface des cellules. Pour déduire cette fraction, il faudrait ajouter du bleu de trypan au milieu de culture, avant de passer les échantillons dans le cytomètre, pour éteindre le signal du



FAM des siARN complexés au chitosane qui se trouve à la surface des cellules. La fluorescence détectée correspond alors aux siARN qui se trouvent seulement à l'intérieur des cellules (Oliveira et al., 2010). Selon les résultats obtenus par cytométrie en flux, toutes les formulations de chitosane utilisées sont efficaces pour livrer les siARN à l'intérieur de la cellule. Par contre, il est important de déterminer si les nanoparticules internalisées dans la cellule vont permettre la libération des siARN dans le cytoplasme de cette cellule.

L'analyse par microscopie confocale confirme les résultats obtenus par cytométrie en flux. Les nanoparticules ont franchi la première barrière qui est la membrane cellulaire. De plus, les observations en microscopie confocale montrent que les nanoparticules sont internalisées dans les cellules HepG2 transfectées et que le chitosane se dissocie pour libérer la molécule cargo (siARN). En effet, nous avons observé que les siARN marqués avec le fluorophore FAM (vert) sont libérés dans le cytoplasme. Le chitosane a un pouvoir tampon de proton important. Donc, il pourrait s'échapper de l'endosome par effet d'éponge à protons «proton sponge» (Richard, Thibault, De Crescenzo, Buschmann, & Lavertu, 2013). Cet effet cause le gonflement et l'éclatement de l'endosome suite à l'entrée des molécules d'eau par effet osmotique à l'intérieur de l'endosome mature en réponse à la diminution de son pH et l'augmentation de la charge du chitosane qui fait pénétrer des protons accompagnés d'ions comme le  $\text{Cl}^-$  (Sonawane, Szoka, & Verkman, 2003). Le mécanisme de la dissociation des polyplexes n'est pas encore bien compris (Buschmann et al., 2013). Une étude de stabilité des nanoparticules chitosane 92-10-5/ODN-ApoB a été faite dans notre laboratoire. Les ODN sont des molécules qui ont été utilisées pour mimer les siARN. L'étude montre qu'après 20 heures, les nanoparticules se destabilisent et libèrent les ODN à un pH de 7 qui correspond au pH du cytoplasme (De Jesus, 2011; Harvey Lodish, J. D., 1995). Ainsi une incubation à pH plutôt neutre pourrait être la cause de la libération des siARN dans le cytoplasme. Les observations en microscopie confocale ont été effectuées 24 heures après la transfection. Ce délai était suffisant pour permettre la destabilisation des complexes et la libération des siARN. Il existe d'autres facteurs qui peuvent causer la décomplexation tels que la compétition avec les protéines cytoplasmiques chargées négativement et/ou avec les molécules d'ARN (Labat-Moleur et al., 1996). L'objectif est de livrer les siARN au niveau du cytoplasme de la cellule, car c'est à cet endroit que les siARN sont pris en charge par le complexe RISC pour engendrer le silençage du gène cible. Or, des siARN ont été observés dans le cytoplasme, mais aussi dans le noyau cellulaire. Ohrt et al. ont prouvé que l'exportine-5, une protéine qui a pour rôle d'exporter les miARN et les shARN du noyau vers le cytoplasme,

joue un rôle dans l'exclusion des siARN du noyau (Kanasty, Whitehead, Vegas, & Anderson, 2012; Ohrt, Merkle, Birkenfeld, Echeverri, & Schwille, 2006).

L'internalisation des nanoparticules au sein de la cellule a été démontrée par cytométrie en flux. L'échappement endosomal ainsi que la décomplexation des nanoparticules dans le cytoplasme ont été prouvés. L'étape suivante est d'affirmer que les siARN modifiés et non modifiés ne sont pas toxiques et capables de silencer le gène ApoB.

La faible toxicité d'un système de livraison de siARN est cruciale. Pour ce, l'activité métabolique des cellules transfectées par les différentes nanoparticules chitosane/siApoB a été étudiée par le test d'AlamarBlue®. Les résultats de ce test montrent qu'il n'existe pas de différence significative de la viabilité des cellules HepG2 transfectées par les nanocomplexes à base de différentes formulations de chitosane et de différents siApoB. Les modifications chimiques des siARN n'ont induit aucun effet de toxicité. Les nanoparticules chitosane/siApoB sont moins toxiques que le DharmaFECT® siApoB. La toxicité induite par le chitosane/siApoB ne dépasse pas 36% alors que celle induite par le DharmaFECT® /siApoB peut atteindre 60%. D'ailleurs, plusieurs études ont montré que le chitosane 92-10-5 n'est pas toxique (Buschmann et al., 2013). La transfection des cellules HepG2 par des siARN nus montre qu'ils induisent une toxicité comparable à celle induite par les nanoparticules chitosane/siApoB, idem pour les chitosanes seuls. Ceci prouve que la toxicité induite pourrait être due à l'utilisation du milieu de transfection et non pas du chitosane ou des nanocomplexes.

L'efficacité des nanocomplexes chitosane/siApoB à silencer le gène ApoB chez les cellules HepG2 a été étudiée par PCR en temps réel. En général, les nanoparticules chitosane/siApoB ont induit un silençage qui varie entre 20 et 80% dépendamment de la formulation du chitosane et du siARN utilisé. Les résultats de qPCR corrélaient avec les résultats obtenus par cytométrie en flux et le test de stabilité. Le chitosane 80-10-5 qui forme avec les siARN les nanocomplexes les moins stables est le moins efficace. Les formulations les plus efficaces avec les trois siARN sont 92-40-5, 92-10-5 et 80-40-5 menant à l'inhibition d'approximativement 70 % de l'expression de l'ARNm ApoB. En effet, ces formulations ont permis d'avoir des nanoparticules stables à pH 6,5. De plus, la cytométrie en flux a montré qu'ils sont capables de livrer les siApoB1 et les siApoB2 efficacement. Plusieurs études ont montré que le chitosane à faible masse moléculaire pourrait être plus efficace pour avoir un bon silençage (Alameh et al., 2012; Techaarpornkul et al., 2010). Les chitosanes à masse moléculaire élevée

forment des particules très stables ce qui pourrait empêcher leurs dissociations dans le cytoplasme (Al-Qadi et al., 2012). De plus, il existe des études qui ont montré qu'ils forment des nanoparticules de plus grande taille ce qui empêche leur internalisation dans la cellule (Techaarpornkul et al., 2010). Les résultats de PCR en temps réel montrent que l'augmentation de la masse moléculaire pour le même DDA n'affecte pas l'efficacité du silençage. Ainsi, il n'existe pas une différence significative entre l'efficacité du silençage des nanoparticules 92-40-5/siApoB, 92-10-5/siApoB et 80-10-5/siApoB. Contrairement aux résultats obtenus avec ADNp, l'efficacité de transfection a diminué quand la masse moléculaire du chitosane à DDA égal à 92 a été augmentée de 10 à 40 à pH 6,5. Alors qu'à pH7, cette augmentation a beaucoup amélioré la transfection (Lavertu et al., 2006). Ceci confirme que les nanoparticules chitosane/siARN sont différentes des nanoparticules chitosane/siADNp. En effet, d'autres études montrent que les formulations du chitosane les plus efficaces pour livrer les siARN sont différentes de celles qui sont les meilleures pour livrer l'ADNp. Un chitosane avec MM inférieur à 10 ne peut pas former des particules efficaces pour la livraison des siARN, mais il peut le faire pour l'ADNp (Al-Qadi et al., 2012).

D'autre part, le taux d'ARNm ApoB chez les cellules HepG2 transfectées par des nanoparticules à base de chitosane avec un DDA égal à 92 est moins important que celui chez les cellules transfectées avec des nanoparticules avec un chitosane de DDA égal à 80. De même, l'étude de stabilité a montré que la série de 80 est moins stable.

De façon globale, il n'existe pas de différence significative entre le silençage par des nanoparticules chitosane/siApoB1 et par des nanoparticules chitosane/siApoB2. En effet, l'utilité de l'utilisation des siARN modifiés n'est pas seulement l'amélioration de l'internalisation cellulaire, la stabilité et la résistance contre la dégradation des nucléases, mais aussi la réduction des effets hors cibles. Howard et al. ont utilisé des siARN modifiés par 2'-O-méthylation livré par le chitosane. Il a montré que la modification des siARN diminue l'efficacité, mais réduit les effets hors cibles notamment la réponse inflammatoire de l'interféron de type I (IFN) (Howard et al., 2008).

La qRT-PCR démontre que les nanoparticules chitosane 92-10-5/siApoB1 sont capables de silencer le gène ApoB d'approximativement 70% chez les cellules HepG2. Alors que, l'étude de De Jesus a montrée que les nanoparticules 92-10-5/siApoB1 mènent à un silençage d'approximativement 50% chez les mêmes cellules (De Jesus, 2011). Dans la présente étude, les

transfections des cellules HepG2 a été faite en présence de sérum dans le milieu de transfection alors que les transfections de l'étude De Jesus étaient sans sérum. Le FBS a été ajouté 4 heures après la transfection. En effet, plusieurs études confirment que le sérum améliore l'efficacité de transfection du chitosane (Buschmann et al., 2013; De Jesus, 2011; Nimesh et al., 2010; Sato, Ishii, & Okahata, 2001). Donc, l'efficacité du silençage du gène ApoB chez les cellules HepG2 par les nanoparticules chitosane/siApoB a été améliorée en ajoutant du FBS (10%). L'ajout de sérum au milieu de transfection pourrait améliorer la division cellulaire, l'endocytose et le fonctionnement cellulaire de façon générale (Nimesh et al., 2010; Sato et al., 2001). Ce qui permettrait une bonne internalisation des nanoparticules. Le sérum a même amélioré l'internalisation du chitosane seul qui pourrait former des particules condensées avec les protéines sériques. En effet, le relâchement endosomal des nanocomplexes peut être facilité par l'augmentation de l'internalisation de la fraction de chitosane libre quand N : P égal à 5 (Buschmann et al., 2013; De Jesus, 2011; Thibault, Marc et al., 2011). L'amélioration de la transfection des cellules par les nanocomplexes en présence du sérum présente un avantage par rapport à d'autres vecteurs non viraux comme le PEI et les liposomes. Ce privilège permet au chitosane d'être utilisé cliniquement comme un système de livraison des acides nucléiques (Buschmann et al., 2013; Erbacher, Zou, Bettinger, Steffan, & Remy, 1998; Sato et al., 2001).

La comparaison du silençage génique induit par les siARN nus et les siARN livrés par le chitosane montre l'importance de l'utilisation de ce polymère comme un système de livraison des siARN. En effet, le silençage du gène ApoB *in vitro* par les siARN nus ne dépasse pas 18%. Par contre, plus que 80% d'ARNm ApoB ont été silençés par les nanoparticules 92-40-5/siApoB2. D'où l'importance de l'utilisation du chitosane comme système de livraison efficace.

En guise de conclusion, la caractérisation physicochimique des nanoparticules chitosane/siApoB a permis de sélectionner les formulations qui vont être utilisées dans l'étude *in vitro*. De plus, elle a confirmé que la modification chimique ne diminue pas l'interaction des siARN avec le chitosane. L'étude *in vitro* a permis de comparer l'efficacité et la toxicité des nanoparticules à base de siApoB modifiés et non modifiés livrés par le chitosane. Les résultats ont montré que les modifications chimiques n'ont aucun effet sur la toxicité et sur l'efficacité du silençage. Par contre, son utilisation *in vivo* est prometteuse à fin de prévenir les effets non spécifiques et les effets immunostimulateurs.

### 5.3 Étude de l'efficacité de silençage du gène ApoB *in vivo*

Une preuve de concept qui a pour but d'évaluer l'efficacité des nanoparticules 92-10-5/siApoB1 injectés par voie intraveineuse a été réalisée dans notre laboratoire (De Jesus, 2011). Les injections de traitement (1mg/kg/injection) que les souris C57BL/6 suivant une diète riche en gras avaient reçu a permis de réduire le phénotype de la maladie. Le taux de la protéine apolipoprotéine B dans le sang a diminué de 30% chez les souris traitées par rapport aux souris qui ont reçu une diète riche et qui n'ont reçu aucun traitement. Ce traitement a permis aux souris d'atteindre le niveau d'ApoB normal en circulation. De plus, le cholestérol LDL/VLDL a diminué d'approximativement 20% (De Jesus, 2011). Dans la présente étude, nous avons collecté les échantillons d'ARN extraits par TRIzol® à partir du foie. L'ARN total des cellules du foie a été migré par électrophorèse capillaire sur des nanopuces de la machine Bioanalyzer afin de vérifier sa qualité. La moyenne des RIN est égale à 5,8. Ceci corrèle avec la moyenne des RIN de l'ARN extrait du tissu du foie par Agilent Technologies qui est égale à  $6,49 \pm 0,86$  (Qiagen, 2013). L'ARN des souris qui n'ont pas reçu de traitement et qui ont suivi une diète riche avait un faible nombre d'intégrité (2,4). Hypothétiquement, le faible RIN de ces échantillons pourrait être dû à la difficulté d'extraire de l'ARN à partir de cellules graisseuses. Les coupes histologiques des foies de ces souris ont montré qu'il y a des vacuoles de gras dans les tissus (De Jesus, 2011). La compagnie Qiagen recommande d'utiliser le kit RNeasy Lipid Tissue® pour extraire l'ARN des tissus gras (Qiagen, 2013). Ces échantillons ont été utilisés quand même dans la qPCR, mais l'amplification n'a pas eu lieu. Ceci est peut-être dû soit à la dégradation de l'ARN, soit à l'inhibition de la RT-PCR et/ou la qPCR. En effet, plusieurs études ont montré que le gras inhibe la PCR (Fleige & Pfaffl, 2006; Wilson, I. G., 1997). Tous les autres échantillons ont été utilisés pour la qPCR. La quantité relative de l'ARNm ApoB chez les souris traitées par rapport à celle chez les souris normales qui n'ont pas reçu de traitement et non pas suivi une diète riche a été étudiée. Le taux de l'ARNm ApoB diminue quand le traitement est plus proche de l'euthanasie c.-à-d. plus les trois injections s'approchent du début de l'étude plus le taux d'ApoB est important. Ceci montre que le traitement par les siApoB ne peut pas être préventif, mais peut réduire le taux d'ApoB après une diète riche même si ce régime alimentaire ne prend pas fin. Par contre, le taux d'ApoB remonte quand le traitement est arrêté et les souris continuent à suivre une diète riche. Au niveau protéomique, toutes les souris traitées par les nanoparticules chitosane 92-10-5/siApoB1 ont un taux d'ApoB dans le sang comparable à celui des souris saines (**Tableau 4.2**) (De Jesus, 2011).

Dans l'étude de Zimmermann et al., les souris C57Bl6 n'ayant reçu qu'une seule injection de 1 mg/kg. Le taux de la protéine ApoB remonte jusqu'au niveau des souris non traitées après 13 jours. Dans la même étude, ils ont testé deux doses de siApoB chez les primates. Le taux de la protéine ApoB remonte après 96 heures quand la dose utilisée est 1 mg/kg et ne remonte plus jusqu'à 264 heures quand la dose utilisée est 2,5 mg/kg (Zimmermann et al., 2006). Ceci montre qu'il faut augmenter la dose pour que l'effet du traitement soit à long terme. Dans notre étude nous avons plutôt augmenté le nombre d'injections. Il est important d'optimiser les doses injectées et leur fréquence à fin de ne pas provoquer l'abétalipoprotéïnémie. L'abétalipoprotéïnémie est une maladie qui se caractérise par la carence d'apolipoprotéine B ce qui entraîne un défaut d'absorption des lipides et de synthèse hépatique des VLDL.

Le niveau d'expression du gène ApoB chez les souris du groupe S5 est égal à 102,9%. Donc, il est comparable à celui des souris saines (100%). Les trois injections avant 2 semaines de l'euthanasie sont suffisantes pour avoir un taux d'ARN de la protéine ApoB normal. Le niveau d'expression relatif du gène ApoB des souris qui ont reçu 3 injections avant 8 semaines avant l'euthanasie est égal à 1129%. Alors que, le groupe de souris S8 a reçu une seule injection 48 heures avant l'euthanasie. Son niveau d'expression du gène ApoB est de l'ordre de 150%. Ces résultats corrélerent avec les résultats de Zimmermann et al. qui ont injecté une seule fois à des souris C57BL/6 les mêmes siApoB1 avec la même dose que nous avons utilisée, mais livrés par des SNALP (*stable nucleic acid lipid particles*). Après 48 heures de l'injection intraveineuse, ils ont obtenu un silençage du gène ApoB du foie supérieur à 80% (Zimmermann et al., 2006). Les siARN utilisés dans cette étude *in vivo* ont montré leur efficacité. Zimmermann et al. ainsi que Watanabe et al., ont réussi à induire un silençage important à l'aide des siARN non modifiés en injectant la même dose (Watanabe et al., 2009; Zimmermann et al., 2006). Liu et al., ont étudié l'effet du temps sur le silençage. Ils ont injecté à des souris des nanoparticules lipopolymère :siARN avec un ratio 5:1 et une dose de siARN égale à 1 mg/kg. Le silençage après 2 jours est égal à 60 % puis il augmente jusqu'à 80% après une à deux semaines. Après 3 semaines de l'injection, le niveau d'ARNm ApoB dans le foie des souris C57BL/6 augmente de nouveau (Liu, J., Van, Ma, & Yu, 2012).

Nos études ont mis en évidence la capacité que le chitosane 92-10-5 a pour livrer efficacement les siApoB jusqu'aux cellules du foie. Nous avons aussi montré, dans notre laboratoire, que l'administration des nanoparticules (92-10-5)/siApoB1, d'après l'analyse d'hépatotoxicité et

l'analyse histologique du foie, n'a pas causé d'effets hépatotoxiques. En effet, les nanoparticules n'ont pas altéré les taux des enzymes hépatiques intracellulaires AST et ALT (De Jesus, 2011). De plus, nous avons confirmé que la dose des siARN utilisés livrés par le chitosane permet d'inhiber la surexpression, causée par la diète riche, du gène ApoB et de diminuer le taux de la protéine dans le sang (**Tableau 4.2**). Par contre, le niveau d'ARNm ApoB augmente de nouveau après 5 semaines de la dernière injection. C'est pour cette raison qu'il faudrait optimiser le traitement afin qu'il soit efficace à court et à long terme. L'augmentation de la dose a montré son efficacité dans d'autres études. Cependant, l'utilisation de siARN modifiés *in vivo* est une alternative prometteuse. Avantageusement, la modification des siARN augmente la durée du silençage (Kenski et al., 2012). De plus, notre étude *in vitro* a montré l'efficacité et la faible toxicité des nanoparticules chitosane/siARN modifiés.

## CONCLUSION

L'apolipoprotéine B constitue un élément structurel essentiel des LDL. Le taux élevé des LDL et des ApoB est fortement associé avec le développement de l'athérosclérose. L'athérosclérose est initiée par la reconnaissance de l'ApoB par les récepteurs de LDL (LDLr) qui se trouve au niveau intimal de l'artère. La diminution du taux d'ApoB est une approche thérapeutique unique qui mène à l'arrêt de la progression de la maladie. Les petits ARN interférents (siARN) sont des petites molécules d'ARN doubles brins qui sont capables d'induire la dégradation de l'ARN messager du gène cible. La traduction de la protéine codée est alors empêchée par le silençage du gène cible. Dans le cadre de ce projet de recherche, nous avons réussi à obtenir des nanoparticules chitosane/siApoB et nous avons démontré leur faible toxicité et leur efficacité *in vitro* et *in vivo*.

Nous avons caractérisé les propriétés physicochimiques de différents types de nanoparticules chitosane/siARN. Nous avons montré qu'ils sont capables de transfecter les cellules humaines d'hépatocytes HepG2. Nous avons prouvé que les nanoparticules sont moins toxiques que les agents de transfection commercialisés (DharmaFECT<sup>®</sup>) et tout en ayant une efficacité de transfection et d'induction de silençage du gène ApoB comparable.

Des siARN modifiés chimiquement ont été utilisés pour former les nanoparticules à base de chitosane. La modification chimique n'a pas présenté un obstacle pour que les siARN forment des nanoparticules stables avec le chitosane. Les nanoparticules chitosane/siARN modifiés induisent un silençage du gène ApoB comparable aux nanoparticules formées par des siARN non modifiés. Toutefois, l'utilisation des modifications chimiques des siARN livrés par le chitosane est une stratégie encourageante qui pourrait augmenter la durée du silençage *in vivo*. De plus, elle permet de prévenir les effets hors cible.

D'un autre côté, nous avons étudié le niveau d'expression du gène ApoB chez les souris qui ont suivi une diète riche en gras et à qui des nanoparticules chitosane 92-10-5/siApoB non modifiés ont été administrées. Nous avons prouvé que les nanoparticules 92-10-5/siApoB sont capables de réduire le taux d'ARNm jusqu'au niveau des ARNm ApoB chez les souris saines. Au niveau phénotypique, notre groupe de recherche a déjà montré que la protéine ApoB-100 a aussi été réduite. Le profil des enzymes hépatiques des souris traitées n'a pas montré que le traitement provoque des effets toxiques au niveau du foie.



Dans la poursuite de nos travaux, il serait crucial de développer une suite de l'étude animale afin d'évaluer les nanoparticules chitosane/siARN modifiés et non modifiés sur des modèles de souris athérosclérotiques tout en utilisant différentes doses. Le but de cette étude serait de mieux comprendre le mécanisme d'action de ces nanoparticules et de sélectionner la meilleure combinaison de formulation de chitosane et de siApoB et la meilleure dose qui permettent un silençage à court et à long terme.

## BIBLIOGRAPHIE

- AgilentTechnologies. (2004). Tiré de <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5989-1165EN.pdf>
- Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N., & Aminabhavi, T. M. (2004). Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 100(1), 5-28.
- Ait-Oufella, H., Tedgui, A., & Mallat, Z. (2006). Les lymphocytes T régulateurs protègent contre le développement de l'athérosclérose. *MT Cardio*, 2(6), 651-657.
- Ait-Oufella, H., Tedgui, A., & Mallat, Z. (2008). L'athérosclérose: une maladie inflammatoire. *Sang Thrombose Vaisseaux*, 20(1), 25-33.
- Akhtar, S., & Benter, I. F. (2007). Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, 117(12), 3623-3632.
- Akinc, A., Zumbuehl, A., Goldberg, M., Leshchiner, E. S., Busini, V., Hossain, N., . . . Alvarez, R. (2008). A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. *Nature biotechnology*, 26(5), 561-569.
- Al-Dosari, M. S., & Gao, X. (2009). Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *The AAPS journal*, 11(4), 671-681.
- Al-Qadi, S., Grenha, A., & Remuñán-López, C. (2012). Chitosan and its derivatives as nanocarriers for siRNA delivery.
- Alameh, M., DeJesus, D., Jean, M., Darras, V., Thibault, M., Lavertu, M., . . . Merzouki, A. (2012). Low molecular weight chitosan nanoparticulate system at low N: P ratio for nontoxic polynucleotide delivery. *International journal of nanomedicine*, 7 1399.
- Alameh, M., Jean, M., DeJesus, D., Buschmann, M. D., & Merzouki, A. (2010). Chitosanase-based method for RNA isolation from cells transfected with chitosan/siRNA nanocomplexes for real-time RT-PCR in gene silencing. *International journal of nanomedicine*, 5 473.
- Amarzguioui, M., Holen, T., Babaie, E., & Prydz, H. (2003). Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Research*, 31(2), 589-595.
- Amarzguioui, M., & Prydz, H. (2004). An algorithm for selection of functional siRNA sequences. *Biochemical and biophysical research communications*, 316(4), 1050-1058.
- Amarzguioui, M., Rossi, J. J., & Kim, D. (2005). Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi. *FEBS letters*, 579(26), 5974-5981.
- Ason, B., Castro-Perez, J., Tep, S., Stefanni, A., Tadin-Strapps, M., Roddy, T., . . . Flanagan, W. M. (2011). ApoB siRNA-induced liver steatosis is resistant to clearance by the loss of fatty acid transport protein 5 (Fatp5). *Lipids*, 46(11), 991-1003.
- Baigude, H., McCarroll, J., Yang, C.-s., Swain, P. M., & Rana, T. M. (2007). Design and creation of new nanomaterials for therapeutic RNAi. *ACS chemical biology*, 2(4), 237-241.
- Balazs, D. A., & Godbey, W. (2010). Liposomes for use in gene delivery. *Journal of drug delivery*, 2011.

- Ballantyne, C. M., Corsini, A., Davidson, M. H., Holdaas, H., Jacobson, T. A., Leitersdorf, E., . . . Stein, E. A. (2003). Risk for myopathy with statin therapy in high-risk patients. *Archives of Internal Medicine*, 163(5), 553-564.
- Bangert, W. J. M. a. S. K. (2008). *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects*.
- Barreau, C., Dutertre, S., Paillard, L., & Osborne, H. B. (2006). Liposome-mediated RNA transfection should be used with caution. *Rna*, 12(10), 1790-1793.
- Barrett, S. E., Abrams, M. T., Burke, R., Carr, B. A., Crocker, L. S., Garbaccio, R. M., . . . Latham, A. H. (2014). An *in vivo* evaluation of amphiphilic, biodegradable peptide copolymers as siRNA delivery agents. *International journal of pharmaceutics*, 466(1), 58-67.
- Behlke, M. A. (2008). Chemical modification of siRNAs for in vivo use. *Oligonucleotides*, 18(4), 305-320.
- Benditt, E. P. (1977). The origin of atherosclerosis. *Sci Am*, 236(2), 74-85.
- Benn, M. (2009). Apolipoprotein B levels, APOB alleles, and risk of ischemic cardiovascular disease in the general population, a review. *Atherosclerosis*, 206(1), 17-30.
- Birgit Fogal, & Pober, J. S. (2012). Vascular Endothelial Cells as Immunological Targets in Atherosclerosis. *Inflammation and Atherosclerosis* pp 87-114. doi: 10.1007/978-3-7091-0338-8\_6
- Bishop, N. (1997). An Update on Non-clathrin-coated Endocytosis. *Reviews in medical virology*, 7(4), 199-209.
- Borén, J., Lee, I., Zhu, W., Arnold, K., Taylor, S., & Innerarity, T. L. (1998). Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective apo-B100. *Journal of Clinical Investigation*, 101(5), 1084.
- Braasch, D. A., Jensen, S., Liu, Y., Kaur, K., Arar, K., White, M. A., & Corey, D. R. (2003). RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. *Biochemistry*, 42(26), 7967-7975.
- Bramsen, J. B., Laursen, M. B., Damgaard, C. K., Lena, S. W., Babu, B. R., Wengel, J., & Kjems, J. (2007). Improved silencing properties using small internally segmented interfering RNAs. *Nucleic Acids Research*, 35(17), 5886-5897.
- Braunwald, E. (1997). Cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *New England Journal of Medicine*, 337(19), 1360-1369.
- Broisat, A., Riou, L., Fagret, D., & Ghezzi, C. (2005). Physiopathologie de la plaque d'athérome vulnérable. *Médecine Nucléaire-Imagerie fonctionnelle et métabolique*, 29(4), 199.
- Brown, M. S., Basu, S. K., Falck, J., Ho, Y., & Goldstein, J. L. (1980). The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation: Specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively-charged LDL by macrophages. *Journal of supramolecular structure*, 13(1), 67-81.

- Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1983). Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annual review of biochemistry*, 52(1), 223-261.
- Bruce Alberts, A. J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. (2002). *MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL* (4th edition<sup>e</sup> éd.). New York.
- Burchard, J., Jackson, A. L., Malkov, V., Needham, R. H., Tan, Y., Bartz, S. R., . . . Linsley, P. S. (2009). MicroRNA-like off-target transcript regulation by siRNAs is species specific. *Rna*, 15(2), 308-315.
- Burnier, L., Fontana, P., Angelillo-Scherrer, A., & Kwak, B. R. (2009). Intercellular communication in atherosclerosis. *Physiology*, 24(1), 36-44.
- Buschmann, M. D., Merzouki, A., Lavertu, M., Thibault, M., Jean, M., & Darras, V. (2013). Chitosans for delivery of nucleic acids. *Advanced drug delivery reviews*, 65(9), 1234-1270.
- Chan, L., Chang, B. H. J., Liao, W., Oka, K., & Lau, P. P. (2000). Apolipoprotein B: from editosome to proteasome. *Recent Progress in Hormone Research*, 55 93-126.
- Chen, S. H., Habib, G., Yang, C. Y., Gu, Z. W., Lee, B. R., Weng, S. A., . . . Rosseneu, M. (1987). Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science (New York, NY)*, 238(4825), 363.
- Chiu, Y. L., & Rana, T. M. (2003). siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *Rna*, 9(9), 1034-1048.
- Choi, Y. S., Lee, J. Y., Suh, J. S., Kwon, Y. M., Lee, S. J., Chung, J. K., . . . Park, Y. J. (2010). The systemic delivery of siRNAs by a cell penetrating peptide, low molecular weight protamine. *Biomaterials*, 31(6), 1429-1443.
- Choung, S., Kim, Y. J., Kim, S., Park, H. O., & Choi, Y. C. (2006). Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy. *Biochemical and biophysical research communications*, 342(3), 919-927.
- Clark, P. R., Pober, J. S., & Kluger, M. S. (2008). Knockdown of TNFR1 by the sense strand of an ICAM-1 siRNA: dissection of an off-target effect. *Nucleic Acids Research*, 36(4), 1081-1097.
- Conference-Board-of-Canada. (2010). The Canadian Heart Health Strategy: Risk Factors and Future Cost Implications Report. Tiré de <http://www.heartandstroke.com/site/c.ikIQLcMWJtE/b.3483991/k.34A8/Statistics.htm>
- Crooke, R. M., Graham, M. J., Lemonidis, K. M., Whipple, C. P., Koo, S., & Perera, R. J. (2005). An apolipoprotein B antisense oligonucleotide lowers LDL cholesterol in hyperlipidemic mice without causing hepatic steatosis. *Journal of lipid research*, 46(5), 872-884.
- Daugherty, A. (2002). Mouse models of atherosclerosis. *The American journal of the medical sciences*, 323(1), 3-10.
- Davidson, N. O., & Shelness, G. S. (2000). Apolipoprotein B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. *Annual review of nutrition*, 20(1), 169-193.

- Dawber, T. R., Moore, F. E., & Mann, G. V. (1957). II. Coronary heart disease in the Framingham study. *American Journal of Public Health and the Nations Health*, 47(4\_Pt\_2), 4-24.
- De Jesus, D. L. (2011). *Silencage génique de l'ARNm codant pour l'apolipoprotéine B après administration par voie intraveineuse de nanoparticules chitosane/siARN-ApoB dans un modèle murin d'athérosclérose*. (École Polytechnique de Montréal).
- De Winther, M. P. J., Kanters, E., Kraal, G., & Hofker, M. H. (2005). Nuclear factor  $\kappa$ B signaling in atherogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 25(5), 904-914.
- Dharmacon. (2014). Tiré de <http://dharmacon.gelifesciences.com/sirna/siglo-green-transfection-indicator/>
- Diebold, S. S., Massacrier, C., Akira, S., Paturel, C., Morel, Y., & Reis e Sousa, C. (2006). Nucleic acid agonists for Toll-like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides. *European journal of immunology*, 36(12), 3256-3267.
- Dobrovolskaia, M. A., & McNeil, S. E. (2007). Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature Nanotechnology*, 2(8), 469-478.
- Douglas, K. L., Piccirillo, C. A., & Tabrizian, M. (2008). Cell line-dependent internalization pathways and intracellular trafficking determine transfection efficiency of nanoparticle vectors. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68(3), 676-687.
- Duceppe, N., & Tabrizian, M. (2010). Advances in using chitosan-based nanoparticles for in vitro and in vivo drug and gene delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 7(10), 1191-1207.
- Duriez, P. (2004). Mécanismes de formation de la plaque d'athérome. *La revue de médecine interne*, 25 S3-S6.
- Durrington, P. N. (2002). Can measurement of apolipoprotein B replace the lipid profile in the follow-up of patients with lipoprotein disorders? *Clinical chemistry*, 48(3), 401-402.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., & Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *nature*, 411(6836), 494-498.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & development*, 15(2), 188-200.
- Encyclopaedia Britannica. (2014). low-density lipoprotein. Tiré de [www.britannica.com/EBchecked/media/92254/Cutaway-view-of-a-low-density-lipoprotein-complex-The-LDL](http://www.britannica.com/EBchecked/media/92254/Cutaway-view-of-a-low-density-lipoprotein-complex-The-LDL)
- Engel, H. J., Engel, E., & Lichtlen, P. (1983). Coronary atherosclerosis and myocardial infarction in young women—role of oral contraceptives. *European Heart Journal*, 4(1), 1-8.
- Erbacher, P., Zou, S., Bettinger, T., Steffan, A.-M., & Remy, J.-S. (1998). Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. *Pharmaceutical Research*, 15(9), 1332-1339.
- Fattal, E., & Bochot, A. (2006). Ocular delivery of nucleic acids: antisense oligonucleotides, aptamers and siRNA. *Advanced drug delivery reviews*, 58(11), 1203-1223.

- FDA. (2014, 31/01/2014). FDA Expands Advice on Statin Risks. Tiré de <http://www.fda.gov/forconsumers/consumerupdates/ucm293330.htm>
- Fernandes, J. C., Qiu, X., Winnik, F. M., Benderdour, M., Zhang, X., Dai, K., & Shi, Q. (2012). Low molecular weight chitosan conjugated with folate for siRNA delivery in vitro: optimization studies. *International journal of nanomedicine*, 7 5833.
- FHS, F. H. S. (2012). Tiré de <http://www.framinghamheartstudy.org/>
- Fire, A., Xu, S. Q., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *nature*, 391(6669), 806-811.
- Fleige, S., & Pfaffl, M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular aspects of medicine*, 27(2), 126-139.
- Frostegård, J. (2013). Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. *BMC medicine*, 11(1), 117.
- Galkina, E., & Ley, K. (2009). Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annual review of immunology*, 27 165.
- Gao, S., Chen, J., Xu, X., Ding, Z., Yang, Y. H., Hua, Z., & Zhang, J. (2003). Galactosylated low molecular weight chitosan as DNA carrier for hepatocyte-targeting. *International journal of pharmaceutics*, 255(1), 57-68.
- Garcia-Fuentes, M., & Alonso, M. J. (2012). Chitosan-based drug nanocarriers: where do we stand? *Journal of Controlled Release*, 161(2), 496-504.
- Gary, D. J., Puri, N., & Won, Y.-Y. (2007). Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 121(1), 64-73.
- Geary, R. S., Watanabe, T. A., Truong, L., Freier, S., Lesnik, E. A., Sioufi, N. B., . . . Levin, A. A. (2001). Pharmacokinetic properties of 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified oligonucleotide analogs in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 296(3), 890-897.
- Ghosn, B., Singh, A., Li, M., Vlassov, A. V., Burnett, C., Puri, N., & Roy, K. (2010). Efficient gene silencing in lungs and liver using imidazole-modified chitosan as a nanocarrier for small interfering RNA. *Oligonucleotides*, 20(3), 163-172.
- Glass, C. K., & Witztum, J. L. (2001). Atherosclerosis: The Road Ahead Review. *Cell*, 104 503-516.
- Glover, D. J., Lipps, H. J., & Jans, D. A. (2005). Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nature Reviews Genetics*, 6(4), 299-310.
- Glud, S. Z., Bramsen, J. B., Dagnæs-Hansen, F., Wengel, J., Howard, K. A., Nyengaard, J. R., & Kjems, J. (2009). Naked siLNA-mediated gene silencing of lung bronchoepithelium EGFP expression after intravenous administration. *Oligonucleotides*, 19(2), 163-168.
- Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (1977). Atherosclerosis: the low-density lipoprotein receptor hypothesis. *Metabolism*, 26(11), 1257-1275.

- Guidry, E. N., Farand, J., Soheili, A., Parish, C. A., Kevin, N. J., Pipik, B., . . . Latham, A. H. (2014). Improving the in vivo therapeutic index of siRNA polymer conjugates through increasing pH responsiveness. *Bioconjugate chemistry*, 25(2), 296-307.
- Gupta, S., Pablo, A. M., c Jiang, X., Wang, N., Tall, A. R., & Schindler, C. (1997). IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *Journal of Clinical Investigation*, 99(11), 2752.
- Guy, J., Drabek, D., & Antoniou, M. (1995). Delivery of DNA into mammalian cells by receptor-mediated endocytosis and gene therapy. *Molecular biotechnology*, 3(3), 237-248.
- Hall, A. H. S., Wan, J., Shaughnessy, E. E., Shaw, B. R., & Alexander, K. A. (2004). RNA interference using boranophosphate siRNAs: structure–activity relationships. *Nucleic acids research*, 32(20), 5991-6000.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Kim, Y. K., Jin, H., & Kim, V. N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development*, 18(24), 3016-3027.
- Hansson, G. K. (2001). Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 21(12), 1876-1890.
- Hansson, G. K., & Libby, P. (2006). The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*, 6(7), 508-519.
- Harborth, J., Elbashir, S. M., Vandenburgh, K., Manninga, H., Scaringe, S. A., Weber, K., & Tuschl, T. (2003). Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*, 13(2), 83-105.
- Harvey Lodish, A. B., Paul Matsudaira, James Darnell. (2004). *Biologie moléculaire de la cellule*. New York
- Harvey Lodish, J. D. (1995). *Molecular cell biology*. New York and Oxford: W.H. Freeman and Company.
- Hattori, Y., Nakamura, A., Arai, S., Nishigaki, M., Ohkura, H., Kawano, K., . . . Yonemochi, E. (2014). < i> In vivo</i> siRNA delivery system for targeting to the liver by poly-l-glutamic acid-coated lipoplex. *Results in Pharma Sciences*, 4 1-7.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., . . . Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science Signalling*, 303(5663), 1526.
- Hirano, S. (1999). Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polymer International*, 48(8), 732-734.
- Hofker, M. H., van Vlijmen, B. J., & Havekes, L. M. (1998). Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 137(1), 1-11.
- Holzerny, P., Ajdini, B., Heusermann, W., Bruno, K., Schuleit, M., Meinel, L., & Keller, M. (2012). Biophysical properties of chitosan/siRNA polyplexes: Profiling the polymer/siRNA interactions and bioactivity. *Journal of controlled release*, 157(2), 297-304.

- Hoppe-Seyler, F. (2006). Ueber chitin und cellulose. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 27(3), 3329-3331.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzózka, K., Jung, A., Kato, H., . . . Schlee, M. (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science Signalling*, 314(5801), 994.
- Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., . . . De Fougerolles, A. (2005). Sequence-specific potent induction of IFN- $\alpha$  by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nature medicine*, 11(3), 263-270.
- Howard, K. A., Paludan, S. R., Behlke, M. A., Besenbacher, F., Deleuran, B., & Kjems, J. (2008). Chitosan/siRNA nanoparticle-mediated TNF- $\alpha$  knockdown in peritoneal macrophages for anti-inflammatory treatment in a murine arthritis model. *Molecular Therapy*, 17(1), 162-168.
- Howard, K. A., Rahbek, U. L., Liu, X., Damgaard, C. K., Glud, S. Z., Andersen, M. Ø., . . . Besenbacher, F. (2006). RNA interference in vitro and in vivo using a chitosan/siRNA nanoparticle system. *Molecular Therapy*, 14(4), 476-484.
- Huang, M., Fong, C.-W., Khor, E., & Lim, L.-Y. (2005). Transfection efficiency of chitosan vectors: effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation. *Journal of Controlled Release*, 106(3), 391-406.
- Huang, M., Ma, Z., Khor, E., & Lim, L.-Y. (2002). Uptake of FITC-chitosan nanoparticles by A549 cells. *Pharmaceutical research*, 19(10), 1488-1494.
- Huber, S., Sakkinen, P., David, C., Newell, M., & Tracy, R. (2001). T helper-cell phenotype regulates atherosclerosis in mice under conditions of mild hypercholesterolemia. *Circulation*, 103(21), 2610-2616.
- Ingelsson, E., Schaefer, E. J., Contois, J. H., McNamara, J. R., Sullivan, L., Keyes, M. J., . . . D'Agostino, R. B. (2007). Clinical utility of different lipid measures for prediction of coronary heart disease in men and women. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 298(7), 776-785.
- Innerarity, T. L., Mahley, R. W., Weisgraber, K. H., Bersot, T. P., Krauss, R., Vega, G., . . . McCarthy, B. (1990). Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *Journal of lipid research*, 31(8), 1337-1349.
- Islama, M. M., Masumb, S. M., Rahmana, M. M., Mollab, M. A. I., Shaikhc, A., & Roya, S. Preparation of Chitosan from Shrimp Shell and Investigation of Its Properties.
- Ito, M. K. (2007). ISIS 301012 Gene Therapy for Hypercholesterolemia: Sense, Antisense, or Nonsense? *The Annals of pharmacotherapy*, 41(10), 1669-1678.
- Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., . . . Linsley, P. S. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature biotechnology*, 21(6), 635-637.
- Jackson, A. L., Burchard, J., Leake, D., Reynolds, A., Schelter, J., Guo, J., . . . Nichols, K. (2006). Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *Rna*, 12(7), 1197-1205.



- Jagla, B., Aulner, N., Kelly, P. D., Song, D., Volchuk, A., Zatorski, A., . . . Ouerfelli, O. (2005). Sequence characteristics of functional siRNAs. *Rna*, 11(6), 864-872.
- Jawien, J., Nastalek, P., & Korbut, R. (2004). Mouse models of experimental atherosclerosis. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 55(3), 503-517.
- Jayakumar, R., Nwe, N., Tokura, S., & Tamura, H. (2007). Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40(3), 175-181.
- Jean, M., Alameh, M., Buschmann, M., & Merzouki, A. (2011). Effective and safe gene-based delivery of GLP-1 using chitosan/plasmid-DNA therapeutic nanocomplexes in an animal model of type 2 diabetes. *Gene therapy*, 18(8), 807-816.
- Jean, M., Alameh, M., De Jesus, D., Thibault, M., Lavertu, M., Darras, V., . . . Merzouki, A. (2011). Chitosan-based Therapeutic nanoparticles for Combination Gene Therapy and Gene Silencing of *in vitro* cell lines relevant to Type 2 Diabetes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*.
- Ji, A., Su, D., Che, O., Li, W., Sun, L., Zhang, Z., . . . Xu, F. (2009). Functional gene silencing mediated by chitosan/siRNA nanocomplexes. *Nanotechnology*, 20(40), 405103.
- Jiang, R., Schulze, M. B., Li, T., Rifai, N., Stampfer, M. J., Rimm, E. B., & Hu, F. B. (2004). Non-HDL cholesterol and apolipoprotein B predict cardiovascular disease events among men with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 27(8), 1991-1997.
- Jones, L. J., Yue, S. T., Cheung, C.-Y., & Singer, V. L. (1998). RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: RiboGreen reagent characterization. *Analytical biochemistry*, 265(2), 368-374.
- Joseph Emmerich, P. B. (2000). *L'athérosclérose*. Paris.
- Judge, A. D., Bola, G., Lee, A. C. H., & MacLachlan, I. (2006). Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Molecular Therapy*, 13(3), 494-505.
- Judge, A. D., Sood, V., Shaw, J. R., Fang, D., McClintock, K., & MacLachlan, I. (2005). Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nature biotechnology*, 23(4), 457-462.
- Jung, C. R., Yoo, J., Jang, Y. J., Kim, S., Chu, I. S., Yeom, Y. I., . . . Im, D. S. (2006). Adenovirus-mediated transfer of siRNA against PTTG1 inhibits liver cancer cell growth in vitro and in vivo. *Hepatology*, 43(5), 1042-1052.
- Kanasty, R. L., Whitehead, K. A., Vegas, A. J., & Anderson, D. G. (2012). Action and reaction: the biological response to siRNA and its delivery vehicles. *Molecular Therapy*, 20(3), 513-524.
- Kang, J.-H., Tachibana, Y., Obika, S., Harada-Shiba, M., & Yamaoka, T. (2012). Efficient reduction of serum cholesterol by combining a liver-targeted gene delivery system with chemically modified apolipoprotein B siRNA. *Journal of Controlled Release*.
- Karikó, K., Buckstein, M., Ni, H., & Weissman, D. (2005). Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*, 23(2), 165-175.

- Kastelein, J. J. P., Wedel, M. K., Baker, B. F., Su, J., Bradley, J. A. D., Rosie, Z. Y., . . . Crooke, R. M. (2006). Potent reduction of apolipoprotein B and low-density lipoprotein cholesterol by short-term administration of an antisense inhibitor of apolipoprotein B. *Circulation*, 114(16), 1729-1735.
- Katas, H., & Alpar, H. O. (2006). Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *Journal of controlled release*, 115(2), 216-225.
- Kean, T., Roth, S., & Thanou, M. (2005). Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: cytotoxicity and transfection efficiency. *Journal of controlled release*, 103(3), 643-653.
- Kenski, D. M., Butora, G., Willingham, A. T., Cooper, A. J., Fu, W., Qi, N., . . . Flanagan, W. M. (2012). siRNA-optimized modifications for enhanced in vivo activity. *Molecular Therapy—Nucleic Acids*, 1(1), e5.
- Khvorova, A., Reynolds, A., & Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115(2), 209-216.
- Kiang, T., Wen, J., Lim, H. W., & Leong, K. W. (2004). The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection. *Biomaterials*, 25(22), 5293-5301.
- Kim, D. H., & Rossi, J. J. (2008). RNAi mechanisms and applications. *Biotechniques*, 44(5), 613.
- Kim, I. Y., Seo, S. J., Moon, H. S., Yoo, M. K., Park, I. Y., Kim, B. C., & Cho, C. S. (2008). Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*, 26(1), 1-21.
- Kim, T. H., Jiang, H. L., Jere, D., Park, I. K., Cho, M. H., Nah, J. W., . . . Cho, C. S. (2007). Chemical modification of chitosan as a gene carrier< i> in vitro</i> and< i> in vivo</i>. *Progress in Polymer Science*, 32(7), 726-753.
- Kim, T. H., Park, I. K., Nah, J. W., Choi, Y. J., & Cho, C. S. (2004). Galactosylated chitosan/DNA nanoparticles prepared using water-soluble chitosan as a gene carrier. *Biomaterials*, 25(17), 3783-3792.
- Kim, V. N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(5), 376-385.
- Kim, Y., Jiang, H., Choi, Y., Park, I., Cho, M., & Cho, C. (2011). Polymeric Nanoparticles of Chitosan Derivatives as DNA and siRNA Carriers. *Chitosan for Biomaterials* 11-21.
- Kim, Y. H., Gihm, S. H., Park, C. R., Lee, K. Y., Kim, T. W., Kwon, I. C., . . . Jeong, S. Y. (2001). Structural characteristics of size-controlled self-aggregates of deoxycholic acid-modified chitosan and their application as a DNA delivery carrier. *Bioconjugate chemistry*, 12(6), 932-938.
- Krajewska, W. M., & Maslowska, I. (2004). Caveolins: structure and function in signal transduction. *CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY LETTERS*, 9(2), 195-220.
- Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8(3), 203-226.

- Kwon, Y. J., Standley, S. M., Goh, S. L., & Fréchet, J. M. J. (2005). Enhanced antigen presentation and immunostimulation of dendritic cells using acid-degradable cationic nanoparticles. *Journal of controlled release*, 105(3), 199-212.
- Labat-Moleur, F., Steffan, A.-M., Brisson, C., Perron, H., Feugeas, O., Furstenberger, P., . . . Behr, J. (1996). An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene therapy*, 3(11), 1010-1017.
- Landen, C. N., Chavez-Reyes, A., Bucana, C., Schmandt, R., Deavers, M. T., Lopez-Berestein, G., & Sood, A. K. (2005). Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery. *Cancer Research*, 65(15), 6910-6918.
- Lasham, A., Herbert, M., Coppieters, N., Wallant, N., Patel, R., Feng, S., Eszes, M., . . . Reid, G. (2010). A rapid and sensitive method to detect siRNA-mediated mRNA cleavage in vivo using 5' RACE and a molecular beacon probe. *Nucleic Acids Research*, 38(3), e19-e19.
- Lau, P. P., Xiong, W., Zhu, H. J., Chen, S. H., & Chan, L. (1991). Apolipoprotein B mRNA editing is an intranuclear event that occurs posttranscriptionally coincident with splicing and polyadenylation. *Journal of Biological Chemistry*, 266(30), 20550-20554.
- Lavertu, M., Méthot, S., Tran-Khanh, N., & Buschmann, M. D. (2006). High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, 27(27), 4815-4824.
- Lavertu, M., Xia, Z., Serre, A., Berrada, M., Rodrigues, A., Wang, D., . . . Gupta, A. (2003). A validated <sup>1</sup>H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32(6), 1149-1158.
- Lee, D. W., Yun, K.-S., Ban, H.-S., Choe, W., Lee, S. K., & Lee, K. Y. (2009). Preparation and characterization of chitosan/polyguluronate nanoparticles for siRNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 139(2), 146-152.
- Lee, D. W., Yun, K. S., Ban, H. S., Choe, W., Lee, S. K., & Lee, K. Y. (2009). Preparation and characterization of chitosan/polyguluronate nanoparticles for siRNA delivery. *Journal of controlled release*, 139(2), 146-152.
- Lee, K., Kwon, I., Kim, Y. H., Jo, W., & Jeong, S. (1998). Preparation of chitosan self-aggregates as a gene delivery system. *Journal of controlled release*, 51(2), 213-220.
- Lee, M.-Y., Park, S.-J., Park, K., Kim, K. S., Lee, H., & Hahn, S. K. (2011). Target-specific gene silencing of layer-by-layer assembled gold-cysteamine/siRNA/PEI/HA nanocomplex. *ACS nano*, 5(8), 6138-6147.
- Leung, R. K., & Whittaker, P. A. (2005). RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacology & therapeutics*, 107(2), 222-239.
- Levy, A. L., & Rottino, A. (1960). Effect of disease states on the ribonuclease concentration of body fluids. *Clinical chemistry*, 6(1), 43-51.
- Li, L., & Shen, Y. (2009). Overcoming obstacles to develop effective and safe siRNA therapeutics.

- Li, Y., Cheng, Q., Jiang, Q., Huang, Y., Liu, H., Zhao, Y., . . . Liang, X. (2014). Enhanced endosomal/lysosomal escape by distearoyl phosphoethanolamine-polycarboxybetaine lipid for systemic delivery of siRNA. *Journal of Controlled Release*, 176 104-114.
- Liao, F., & Andalibi, A. (1993). Genetic control of inflammatory gene induction and NF-kappa B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 91(6), 2572.
- Liao, Z. X., Ho, Y. C., Chen, H. L., Peng, S. F., Hsiao, C. W., & Sung, H. W. (2010). Enhancement of efficiencies of the cellular uptake and gene silencing of chitosan/siRNA complexes via the inclusion of a negatively charged poly ( $\gamma$ -glutamic acid). *Biomaterials*, 31(33), 8780-8788.
- Liu, J., Van, S., Ma, N., & Yu, L. (2012). Efficient systemic delivery of siRNA to the mouse liver by pegylated lipopolymer. *International Journal of Pharmaceutics*, 427(1), 58-63.
- Liu, X., Howard, K. A., Dong, M., Andersen, M. Ø., Rahbek, U. L., Johnsen, M. G., . . . Kjems, J. (2007). The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing. *Biomaterials*, 28(6), 1280-1288.
- Lou, Y. L., Peng, Y. S., Chen, B. H., Wang, L. F., & Leong, K. W. (2009). Poly (ethylene imine)-g-chitosan using EX-810 as a spacer for nonviral gene delivery vectors. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 88(4), 1058-1068.
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., & Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303(5654), 95-98.
- Lupold, S. E., Hicke, B. J., Lin, Y., & Coffey, D. S. (2002). Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen. *Cancer Research*, 62(14), 4029-4033.
- Ma, Z., Li, J., He, F., Wilson, A., Pitt, B., & Li, S. (2005). Cationic lipids enhance siRNA-mediated interferon response in mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 330(3), 755-759.
- Maczuga, P., Lubelski, J., van Logtenstein, R., Borel, F., Blits, B., Fakkert, E., . . . Petry, H. (2012). Embedding siRNA sequences targeting Apolipoprotein B100 in shRNA and miRNA scaffolds results in differential processing and in vivo efficacy. *Molecular Therapy*, 21(1), 217-227.
- Mäkinen, P. I., Koponen, J. K., Kärkkäinen, A. M., Malm, T. M., Pulkkinen, K. H., Koistinaho, J., . . . Ylä-Herttuala, S. (2006). Stable RNA interference: comparison of U6 and H1 promoters in endothelial cells and in mouse brain. *The journal of gene medicine*, 8(4), 433-441.
- Malmo, J., Sørsgård, H., Vårum, K. M., & Strand, S. P. (2011). siRNA delivery with chitosan nanoparticles: Molecular properties favoring efficient gene silencing. *Journal of controlled release*.
- Malvern. (2013). Tiré de [http://www.malvern.com/labeng/technology/dynamic\\_light\\_scattering/dynamic\\_light\\_scattering.htm](http://www.malvern.com/labeng/technology/dynamic_light_scattering/dynamic_light_scattering.htm)

- MalvernInstruments. (2013). Tiré de [http://www.malverninstruments.fr/labfre/products/iwtm/zeta\\_potential.htm](http://www.malverninstruments.fr/labfre/products/iwtm/zeta_potential.htm)
- Manoharan, M. (2004). RNA interference and chemically modified small interfering RNAs. *Current opinion in chemical biology*, 8(6), 570-579.
- Mao, S., Sun, W., & Kissel, T. (2010). Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Advanced drug delivery reviews*, 62(1), 12-27.
- Margineanu, D. (1987). Equilibrium and non-equilibrium approaches in biomembrane thermodynamics. *Archives Of Physiology And Biochemistry*, 95(4), 381-422.
- Marques, J. T., Devosse, T., Wang, D., Zamanian-Daryoush, M., Serbinowski, P., Hartmann, R., . . . Williams, B. R. G. (2006). A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells. *Nature biotechnology*, 24(5), 559-565.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R., & Tuschl, T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, 110(5), 563-574.
- McCarroll, J., Baigude, H., Yang, C.-S., & Rana, T. M. (2009). Nanotubes functionalized with lipids and natural amino acid dendrimers: a new strategy to create nanomaterials for delivering systemic RNAi. *Bioconjugate chemistry*, 21(1), 56-63.
- McQueen, M. J., Hawken, S., Wang, X., Ounpuu, S., Sniderman, A., Probstfield, J., . . . Volkova, E. (2008). Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins as risk markers of myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): a case-control study. *The Lancet*, 372(9634), 224-233.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., & Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular Cell*, 15(2), 185-197.
- Mitnacht, U., Hartmann, H., Hein, S., Oliveira, H., Dong, M., P. Pêgo, A., . . . Schlosshauer, B. (2010). Chitosan/siRNA nanoparticles biofunctionalize nerve implants and enable neurite outgrowth. *Nano letters*, 10(10), 3933-3939.
- Miyawaki-Shimizu, K., Predescu, D., Shimizu, J., Broman, M., Predescu, S., & Malik, A. B. (2006). siRNA-induced caveolin-1 knockdown in mice increases lung vascular permeability via the junctional pathway. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 290(2), L405-L413.
- Mocellin, S., & Provenzano, M. (2004). RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology. *Journal of translational medicine*, 2(1), 39.
- Moghim, S. M., Symonds, P., Murray, J. C., Hunter, A. C., Debska, G., & Szewczyk, A. (2005). A two-stage poly (ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. *Molecular Therapy*, 11(6), 990-995.
- Moosmann, B., & Behl, C. (2004). Selenoprotein synthesis and side-effects of statins. *The Lancet*, 363(9412), 892-894.
- Morozova, S., Suc-Royer, I., & Auwerx, J. (2004). Modulateurs du métabolisme du cholestérol et avenir du traitement de l'athérosclérose. *M/S: médecine sciences*, 20(6-7).

- Mourya, V., & Inamdar, N. N. (2008). Chitosan-modifications and applications: opportunities galore. *Reactive and Functional polymers*, 68(6), 1013-1051.
- Mueller, O., Lightfoot, S., & Schroeder, A. (2004). RNA integrity number (RIN)—Standardization of RNA Quality Control. *Agilent Application Note, Publication 1-8*.
- Mullick, A. E., Fu, W., Graham, M. J., Lee, R. G., Witchell, D., Bell, T. A., . . . Crooke, R. M. (2011). Antisense oligonucleotide reduction of apoB-ameliorated atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Journal of Lipid Research*, 52(5), 885-896.
- Murata, J., Ohya, Y., & Ouchi, T. (1997). Design of quaternary chitosan conjugate having antennary galactose residues as a gene delivery tool. *Carbohydrate polymers*, 32(2), 105-109.
- Nagpal, K., Singh, S. K., & Mishra, D. N. (2010). Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 58(11), 1423-1430.
- Nairn, J. A. (2007). POLYMER STRUCTURE AND CHARACTERIZATION. Dans.
- Nakayama, T., Butler, J. S., Sehgal, A., Severgnini, M., Racie, T., Sharman, J., . . . Tchangov, L. (2012). Harnessing a physiologic mechanism for siRNA delivery with mimetic lipoprotein particles. *Molecular Therapy*, 20(8), 1582-1589.
- Nalbone, G., Peiretti, F., Canault, M., & Alessi, M. C. (2006). Lipides peroxydés et réaction immuno-inflammatoire dans l'athérosclérose. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 13(5), 337-342.
- Nguyen, T., Menocal, E. M., Harborth, J., & Fruehauf, J. H. (2008). RNAi therapeutics: an update on delivery. *Current opinion in molecular therapeutics*, 10(2), 158-167.
- Niidome, T., & Huang, L. (2002). Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene therapy*, 9(24), 1647-1652.
- Nimesh, S., Thibault, M. M., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2010). Enhanced gene delivery mediated by low molecular weight chitosan/DNA complexes: effect of pH and serum. *Molecular biotechnology*, 46(2), 182-196.
- Nishina, K., Unno, T., Uno, Y., Kubodera, T., Kanouchi, T., Mizusawa, H., & Yokota, T. (2008). Efficient in vivo delivery of siRNA to the liver by conjugation of  $\alpha$ -tocopherol. *Molecular Therapy*, 16(4), 734-740.
- No, H. K., & Meyers, S. P. (1995). Preparation and characterization of chitin and chitosan—a review. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 4(2), 27-52.
- Ohrt, T., Merkle, D., Birkenfeld, K., Echeverri, C. J., & Schwille, P. (2006). In situ fluorescence analysis demonstrates active siRNA exclusion from the nucleus by Exportin 5. *Nucleic acids research*, 34(5), 1369-1380.
- Oliveira, H., Pires, L. R., Fernandez, R., Martins, M. C. L., Simões, S., & Pêgo, A. P. (2010). Chitosan-based gene delivery vectors targeted to the peripheral nervous system. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 95(3), 801-810.
- Olofsson, S. O., & Boren, J. (2005). Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. *Journal of internal medicine*, 258(5), 395-410.

- OMS. (2011a, 30/03/2014). Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. Tiré de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/fr/>
- OMS. (2011b, 30/03/2014). Rapport sur la situation mondiale des maladies non transmissibles 2010: Résumé d'orientation.
- . Tiré de [http://www.who.int/nmh/publications/ncd\\_report-summary\\_fr.pdf](http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report-summary_fr.pdf)
- OMS. (2013). Tiré de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/fr/index2.html>
- Orr, G., Panther, D. J., Phillips, J. L., Tarasevich, B. J., Dohnalkova, A., Hu, D., . . . Pounds, J. G. (2007). Submicrometer and nanoscale inorganic particles exploit the actin machinery to be propelled along microvilli-like structures into alveolar cells. *ACS nano*, 1(5), 463-475.
- Paigen, B., Holmes, P. A., Mitchell, D., & Albee, D. (1987). Comparison of atherosclerotic lesions and HDL-lipid levels in male, female, and testosterone-treated female mice from strains C57BL/6, BALB/c, and C3H. *Atherosclerosis*, 64(2), 215-221.
- Paigen, B., Ishida, B. Y., Verstuyft, J., Winters, R. B., & Albee, D. (1990). Atherosclerosis susceptibility differences among progenitors of recombinant inbred strains of mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 10(2), 316-323.
- Paigen, B., Mitchell, D., Reue, K., Morrow, A., Lusis, A. J., & LeBoeuf, R. C. (1987). Ath-1, a gene determining atherosclerosis susceptibility and high density lipoprotein levels in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(11), 3763-3767.
- Park, I., Kim, T., Park, Y., Shin, B., Choi, E., Chowdhury, E., . . . Cho, C. (2001). Galactosylated chitosan-*g*-poly (ethylene glycol) as hepatocyte-targeting DNA carrier. *Journal of controlled release*, 76(3), 349-362.
- Park, I. K., Ihm, J. E., Park, Y., Choi, Y., Kim, S., Kim, W., . . . Cho, C. (2003). Galactosylated chitosan (GC)-graft-poly (vinyl pyrrolidone)(PVP) as hepatocyte-targeting DNA carrier: Preparation and physicochemical characterization of GC-graft-PVP/DNA complex (1). *Journal of controlled release*, 86(2), 349-359.
- Park, J. W., Choi, K. H., & Park, K. K. (1983). Acid-base equilibria and related properties of chitosan. *Bull Kor Chem Soc*, 4(2), 68-72.
- Park, K., Hong, S. W., Hur, W., Lee, M.-Y., Yang, J.-A., Kim, S. W., . . . Hahn, S. K. (2011). Target specific systemic delivery of TGF- $\beta$  siRNA/(PEI-SS)-g-HA complex for the treatment of liver cirrhosis. *Biomaterials*, 32(21), 4951-4958.
- Park, Y., Park, Y., Shin, B., Choi, E., Park, Y., Akaike, T., & Cho, C. (2000). Galactosylated chitosan-*g*-dextran as hepatocyte-targeting DNA carrier. *Journal of controlled release*, 69(1), 97-108.
- Parmar, R. G., Busuek, M., Walsh, E. S., Leander, K. R., Howell, B. J., Sepp-Lorenzino, L., . . . Kochansky, C. J. (2013). Endosomolytic bio-reducible poly (amido amine disulfide) polymer conjugates for the in vivo systemic delivery of siRNA therapeutics. *Bioconjugate chemistry*, 24(4), 640-647.
- Parmar, R. G., Poslusney, M., Busuek, M., Garbaccio, R. M., Williams, J. M., Leander, K., . . . Riley, S. (2014). Novel Endosomolytic Poly (Amido Amine) Polymer Conjugates for Systemic Delivery of siRNA to Hepatocytes in Rodents and Non-human Primates. *Bioconjugate chemistry*.

- Paroo, Z., & Corey, D. R. (2004). Challenges for RNAi in vivo. *TRENDS in Biotechnology*, 22(8), 390-394.
- Parrish, S., Fleenor, J., Xu, S. Q., Mello, C., & Fire, A. (2000). Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Molecular Cell*, 6(5), 1077-1087.
- Patel, M. P., Patel, R. R., & Patel, J. K. (2010). Chitosan mediated targeted drug delivery system: a review. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 13(4), 536-557.
- Pillai, C., Paul, W., & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34(7), 641-678.
- Potteaux, S., Tedgui, A., & Mallat, Z. (2006). Rôle des chimiokines dans l'athérosclérose: complémentarité des recherches fondamentales et cliniques dans l'élaboration de stratégies thérapeutiques. *MT Cardio*, 2(5), 561-570.
- Powell, L. M., Wallis, S. C., Pease, R. J., Edwards, Y. H., Knott, T. J., & Scott, J. (1987). A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell*, 50(6), 831.
- Qiagen. (2013). Tiré de <http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/rna-sample-technologies/total-rna/rneasy-lipid-tissue-mini-kit>
- Rabiller, C. (1999). *Stéréochimie et chiralité en chimie organique*
- Rana, T. M. (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(1), 23-36.
- Randoux, A. (1997). *Biochimie Dynamique*.
- Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I., & Hoekstra, D. (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J*, 377, 159-169.
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W. S., & Khvorova, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nature biotechnology*, 22(3), 326-330.
- Rich-Edwards, J. W., Manson, J. A. E., Hennekens, C. H., & Buring, J. E. (1995). The primary prevention of coronary heart disease in women. *New England Journal of Medicine*, 332(26), 1758-1766.
- Richard, I., Thibault, M., De Crescenzo, G., Buschmann, M. D., & Lavertu, M. (2013). Ionization Behavior of Chitosan and Chitosan-DNA Polyplexes Indicate That Chitosan Has a Similar Capability to Induce a Proton-Sponge Effect as PEI. *Biomacromolecules*.
- Ridker, P. M., Rifai, N., Cook, N. R., Bradwin, G., & Buring, J. E. (2005). Non-HDL cholesterol, apolipoproteins AI and B100, standard lipid measures, lipid ratios, and CRP as risk factors for cardiovascular disease in women. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 294(3), 326-333.
- Rinaudo, M. (2008). Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International*, 57(3), 397-430.



- Robbins, M., Judge, A., Liang, L., & McClintock, K. (2007). 2'-O-methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonists. *Molecular Therapy*, 15(9), 1663-1669.
- Rossi, J. (2005). RNAi therapeutics: SNALPing siRNAs in vivo. *Gene therapy*, 13(7), 583-584.
- Rozema, D. B., Lewis, D. L., Wakefield, D. H., Wong, S. C., Klein, J. J., Roesch, P. L., . . . Blokhin, A. V. (2007). Dynamic PolyConjugates for targeted in vivo delivery of siRNA to hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(32), 12982-12987.
- Rudzinski, W. E., & Aminabhavi, T. M. (2010). Chitosan as a carrier for targeted delivery of small interfering RNA. *International journal of pharmaceutics*, 399(1), 1-11.
- Rutz, S., & Scheffold, A. (2004). Towards in vivo application of RNA interference-new toys, old problems. *Arthritis Research and Therapy*, 6(2), 78-78.
- Sambrook, J., Russell, D. W., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set)* (vol. 999): Cold spring harbor laboratory press Cold Spring Harbor, New York:.
- Sang Yoo, H., Eun Lee, J., Chung, H., Chan Kwon, I., & Young Jeong, S. (2005). Self-assembled nanoparticles containing hydrophobically modified glycol chitosan for gene delivery. *Journal of controlled release*, 103(1), 235-243.
- Santel, A., Aleku, M., Keil, O., Endruschat, J., Esche, V., Durieux, B., . . . Fisch, G. (2006). RNA interference in the mouse vascular endothelium by systemic administration of siRNA-lipoplexes for cancer therapy. *Gene therapy*, 13(18), 1360-1370.
- Sato, T., Ishii, T., & Okahata, Y. (2001). In vitro gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials*, 22(15), 2075-2080.
- Satoh, T., Kano, H., Nakatani, M., Sakairi, N., Shinkai, S., & Nagasaki, T. (2006). 6-Amino-6-deoxy-chitosan. Sequential chemical modifications at the C-6 positions of N-phthaloyl-chitosan and evaluation as a gene carrier. *Carbohydrate research*, 341(14), 2406-2413.
- Scheen, A. (1996). Les statines, du récepteur LDL à la protection cardio-vasculaire. *RMLG. Revue médicale de Liège*, 51(1), 97-101.
- Scheen, A., Radermecker, R., De Flines, J., & Ducobu, J. (2007). Actualites therapeutiques en lipidologie. *Revue Médicale de Liège*, 62(5-6).
- Schreyer, S. A., Wilson, D. L., & LeBoeuf, R. C. (1998). C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 136(1), 17-24.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., . . . Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology*, 7(1), 3.
- Schwarz, D. S., Tomari, Y., & Zamore, P. D. (2004). The RNA-Induced Silencing Complex Is a Mg<sup>2+</sup>-Dependent Endonuclease. *Current Biology*, 14(9), 787-791.
- Segrest, J. P., Jones, M. K., De Loof, H., & Dashti, N. (2001). Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *Journal of lipid research*, 42(9), 1346-1367.

- Segrest, J. P., Jones, M. K., Mishra, V. K., Anantharamaiah, G., & Garber, D. W. (1994). apoB-100 has a pentapartite structure composed of three amphipathic alpha-helical domains alternating with two amphipathic beta-strand domains. Detection by the computer program LOCATE. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 14(10), 1674-1685.
- Segrest, J. P., Jones, M. K., Mishra, V. K., Pierotti, V., Young, S. H., Borén, J., . . . Dashti, N. (1998). Apolipoprotein B-100: conservation of lipid-associating amphipathic secondary structural motifs in nine species of vertebrates. *Journal of lipid research*, 39(1), 85-102.
- Shim, M. S., & Kwon, Y. J. (2010). Efficient and targeted delivery of siRNA in vivo. *FEBS Journal*, 277(23), 4814-4827.
- Shu-Fen Peng, M. T. T., Yi-Cheng Ho, Ming-Cheng Wei, Zi-Xian Liao, Hsing-Wen Sung. (2011). Mechanisms of cellular uptake and intracellular trafficking with chitosan/DNA/poly(g-glutamic acid) complexes as a gene delivery vector. *Biomaterials*. doi: 0.1016/j.biomaterials.2010.08.081
- Simionescu, M., & Sima, A. V. (2012). Morphology of Atherosclerotic Lesions. *Inflammation and Atherosclerosis* 19-37.
- Simpson, L., & Shaw, J. (1989). RNA editing and the mitochondrial cryptogenes of kinetoplastid protozoa. *Cell*, 57(3), 355-366.
- Sinzinger, H., Wolfram, R., & Peskar, B. A. (2002). Muscular side effects of statins. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 40(2), 163-171.
- Sipa, K., Sochacka, E., Kazmierczak-Baranska, J., Maszewska, M., Janicka, M., Nowak, G., & Nawrot, B. (2007). Effect of base modifications on structure, thermodynamic stability, and gene silencing activity of short interfering RNA. *Rna*, 13(8), 1301-1316.
- Smith, J., & Breslow, J. (1997). The emergence of mouse models of atherosclerosis and their relevance to clinical research. *Journal of internal medicine*, 242(2), 99-109.
- Sonawane, N. D., Szoka, F. C., & Verkman, A. (2003). Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(45), 44826-44831.
- Soria, L. F., Ludwig, E. H., Clarke, H., Vega, G. L., Grundy, S. M., & McCarthy, B. J. (1989). Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(2), 587-591.
- Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., . . . Harborth, J. (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *nature*, 432(7014), 173-178.
- St-Pierre, A. C., Cantin, B., Dagenais, G. R., Després, J. P., & Lamarche, B. (2006). Apolipoprotein-B, low-density lipoprotein cholesterol, and the long-term risk of coronary heart disease in men. *The American journal of cardiology*, 97(7), 997.
- Statistics-Canada. (2011). Mortality, summary list of causes 2008. Tiré de <http://www.heartandstroke.com/site/c.ikIQLcMWJtE/b.3483991/k.34A8/Statistics.htm>
- Stocker, R., & Keaney, J. F. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological reviews*, 84(4), 1381-1478.

- Strand, S. P., Danielsen, S., Christensen, B. E., & Vårum, K. M. (2005). Influence of chitosan structure on the formation and stability of DNA-chitosan polyelectrolyte complexes. *Biomacromolecules*, 6(6), 3357-3366.
- Symonds, P., Murray, J. C., Hunter, A. C., Debska, G., Szewczyk, A., & Moghimi, S. M. (2005). Low and high molecular weight poly (l-lysine) s/poly (l-lysine)-DNA complexes initiate mitochondrial-mediated apoptosis differently. *FEBS letters*, 579(27), 6191-6198.
- Tachibana, Y., Munisso, M. C., Kamata, W., Kitagawa, M., Harada-Shiba, M., & Yamaoka, T. (2014). Quick nuclear transportation of siRNA and *in vivo* hepatic ApoB gene silencing with galactose-bearing polymeric carrier. *Journal of biotechnology*, 175 15-21.
- Tadin-Strapps, M., Peterson, L. B., Cumiskey, A. M., Rosa, R. L., Mendoza, V. H., Castro-Perez, J., . . . Yendluri, S. (2011). siRNA-induced liver ApoB knockdown lowers serum LDL-cholesterol in a mouse model with human-like serum lipids. *Journal of Lipid Research*, 52(6), 1084-1097.
- Talmud, P. J., Hawe, E., Miller, G. J., & Humphries, S. E. (2002). Nonfasting apolipoprotein B and triglyceride levels as a useful predictor of coronary heart disease risk in middle-aged UK men. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 22(11), 1918-1923.
- Tang, G. (2005). siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends in biochemical sciences*, 30(2), 106.
- Techaarpornkul, S., Wongkupasert, S., Opanasopit, P., Apirakaramwong, A., Nunthanid, J., & Ruktanonchai, U. (2010). Chitosan-mediated siRNA delivery in vitro: effect of polymer molecular weight, concentration and salt forms. *AAPS PharmSciTech*, 11(1), 64-72.
- Tedgui, A., & Mallat, Z. (2001). Athérosclérose et inflammation.
- Tegos, T. J., Kalodiki, E., Sabetai, M. M., & Nicolaides, A. N. (2001). The genesis of atherosclerosis and risk factors: a review. *Angiology*, 52(2), 89-98.
- Thatte, M. R. (2004). *Synthesis and antibacterial assessment of water-soluble hydrophobic chitosan derivatives bearing quaternary ammonium functionality*. (Louisiana State University).
- Thibault, M., Astolfi, M., Tran-Khanh, N., Lavertu, M., Darras, V., Merzouki, A., & Buschmann, M. D. (2011). Excess polycation mediates efficient chitosan-based gene transfer by promoting lysosomal release of the polyplexes. *Biomaterials*, 32(20), 4639-4646.
- Thibault, M., Nimesh, S., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2010). Intracellular trafficking and decondensation kinetics of chitosan-pDNA polyplexes. *Molecular Therapy*, 18(10), 1787-1795.
- Thouin, J. (2012). *Connaissez-vous votre risque cardiovasculaire?*  
*Les nouveaux et les anciens facteurs de risque* L'Harmattan.
- Urban-Klein, B., Werth, S., Abuharbeid, S., Czubyko, F., & Aigner, A. (2004). RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. *Gene therapy*, 12(5), 461-466.
- Van Belle, E., Bauters, C., & Chru, L. (2006). Histoire naturelle de la rupture de plaque. *Réalités Cardiológicas*.

- Vandenbroucke, J. P., Koster, T., Briet, E., Reitsma, P. H., Bertina, R. M., & Rosendaal, F. R. (1994). Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet*, 344(8935), 1453.
- Vaubourdolle. (2007). *Biochimie, Hématologie* (3e édition ° éd.): Wolters Kluwer France.
- Walldius, G., & Jungner, I. (2006). The apoB/apoA-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy—a review of the evidence. *Journal of internal medicine*, 259(5), 493-519.
- Watanabe, K., Harada-Shiba, M., Suzuki, A., Gokuden, R., Kurihara, R., Sugao, Y., . . . Niidome, T. (2009). In vivo siRNA delivery with dendritic poly (L-lysine) for the treatment of hypercholesterolemia. *Molecular BioSystems*, 5(11), 1306-1310.
- Watts, J. K., Deleavey, G. F., & Damha, M. J. (2008). Chemically modified siRNA: tools and applications. *Drug discovery today*, 13(19), 842-855.
- Wedekind, J. E., Dance, G. S. C., Sowden, M. P., & Smith, H. C. (2003). Messenger RNA editing in mammals: new members of the APOBEC family seeking roles in the family business. *TRENDS in Genetics*, 19(4), 207-216.
- Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and environmental microbiology*, 63(10), 3741.
- Wilson, P. W. F. (1997). An epidemiologic perspective of systemic hypertension, ischemic heart disease, and heart failure. *The American journal of cardiology*, 80(9), 3J-8J.
- Wolfrum, C., Shi, S., Jayaprakash, K. N., Jayaraman, M., Wang, G., Pandey, R. K., . . . Ndungo, E. M. (2007). Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nature biotechnology*, 25(10), 1149-1157.
- Wong, S. C., Klein, J. J., Hamilton, H. L., Chu, Q., Frey, C. L., Trubetskoy, V. S., . . . Lewis, D. L. (2012). Co-injection of a targeted, reversibly masked endosomolytic polymer dramatically improves the efficacy of cholesterol-conjugated small interfering RNAs in vivo. *Nucleic acid therapeutics*, 22(6), 380-390.
- Xu, Y., Ou, M., Keough, E., Roberts, J., Koeplinger, K., Lyman, M., . . . Zhang, R. (2014). Quantitation of Physiological and Biochemical Barriers to siRNA Liver Delivery via Lipid Nanoparticle Platform. *Molecular pharmaceuticals*.
- Yi, H., Wu, L.-Q., Bentley, W. E., Ghodssi, R., Rubloff, G. W., Culver, J. N., & Payne, G. F. (2005). Biofabrication with chitosan. *Biomacromolecules*, 6(6), 2881-2894.
- Ylitalo, R., Lehtinen, S., Wuolijoki, E., Ylitalo, P., & Lehtimäki, T. (2011). Cholesterol-lowering properties and safety of chitosan. *Arzneimittelforschung*, 52(01), 1-7.
- Yu, J. Y., DeRuiter, S. L., & Turner, D. L. (2002). RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), 6047-6052.
- Zhang, H., Kolb, F. A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., & Filipowicz, W. (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*, 118(1), 57-68.

- Zhu, X. L., Du, Y. Z., Yu, R. S., Liu, P., Shi, D., Chen, Y., . . . Huang, F. F. (2013). Galactosylated Chitosan Oligosaccharide Nanoparticles for Hepatocellular Carcinoma Cell-Targeted Delivery of Adenosine Triphosphate. *International journal of molecular sciences*, 14(8), 15755-15766.
- Zimmermann, T. S., Lee, A. C. H., Akinc, A., Bramlage, B., Bumcrot, D., Fedoruk, M. N., . . . John, M. (2006). RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *nature*, 441(7089), 111-114.
- Zolnik, B. S., González-Fernández, Á., Sadrieh, N., & Dobrovolskaia, M. A. (2010). Minireview: nanoparticles and the immune system. *Endocrinology*, 151(2), 458-465.